

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

## **Reaktionstechnische Untersuchungen von *Dunaliella salina* zur Herstellung von $\beta$ -Carotin bei physikalischer Klimasimulation**

**Lara Wolf**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

|                          |    |                                  |
|--------------------------|----|----------------------------------|
| Vorsitzender:            |    | Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling  |
| Prüfer der Dissertation: | 1. | Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz |
|                          | 2. | Prof. Dr. Thomas Brück           |

Die Dissertation wurde am 11.01.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 27.04.2021 angenommen.



*„Geradeaus kann man nicht sehr weit kommen.“*

Der kleine Prinz, Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)





# DANK E

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz. In den letzten vier spannenden Jahren haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die Möglichkeit, dieses vielseitige und herausfordernde Thema bearbeiten zu können. Vielen Dank für Ihr Vertrauen, Ihre Unterstützung – gerade auch in schwierigen Phasen – und alle gewährten Freiheiten! Die Zeit an Ihrem Lehrstuhl werde ich nie vergessen.

Zusätzlich möchte ich mich herzlich beim Co-Referenten Prof. Dr. Thomas Brück und beim Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Andreas Kremling für die Übernahme des jeweiligen Amtes bedanken.

Allen (ehemaligen) Kollegen vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik sowie den Professuren Selektive Trenntechnik und Systembiotechnologie danke ich herzlichst für die hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, für alle fachlichen und nicht ganz so fachlichen Diskussionen und die unvergessliche Zeit am Lehrstuhl. Besonders zu erwähnen sind dabei Ellen, Gabi, Georg, Markus, Marlene, Norbert und Patrick für die großartige Unterstützung bei allen organisatorischen und technischen Fragen. Dir, Norbert, möchte ich zusätzlich für Dein jederzeit offenes Ohr und die schöne gemeinsame Tee- und Kreuzworträtsel-Zeit danken!

Besonders bedanken möchte ich mich bei Hannes und Timm für alle fachlichen Diskussionen und die Unterstützung mit Matlab, beim Algenteam für die tolle Zusammenarbeit, bei Andreas Bauer (Professur für Biothermodynamik) für die Tipps zur Lösemittelauswahl bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion, bei Dr. rer. nat. Martin Haslbeck (Lehrstuhl für Biotechnologie) für die Nutzung des Hochdruckhomogenisators und bei Dr.-Ing. Dominik Maslak, Tina Fritzsche und Jeremy von Poschinger für die tolle Zusammenarbeit im TUM-Technikum für Weiße Biotechnologie im Rahmen der Praktikumsbetreuung.

Ein großes Dankeschön geht auch an Anna Smettan, Andreas Bauer, Christiane Landsherr, Fabian Börner, Inés Villagrasa, Katharina Müller, Konstantina Xypolia, Manfred Reppke, Marianne Volkmar, Nina Ohngemach, Philippe Kollovich, Simon Grieshaber, Susanne Meyer, Thomas Cummings, Veronika Burgmaier und Xiaoxu Li für die hervorragende Unterstützung im Labor.

*„Ein bisschen Freundschaft ist mehr wert als die Bewunderung der ganzen Welt“ (Otto von Bismarck).*  
Ich danke den allerbesten Mehr-Als-Nur-Kollegen und Freunden, die man sich wünschen kann – Ricarda und Ingmar, Corinna und Anton, Tina und Flo, Jacqueline und Lukas, Paula und Dominik, Bine

und Christoph, Jonas und Isi, Catharina und Martin, Amelie, Anna, Fabian, Julia, Kristin und Timm – für kulinarische und kulturelle Hochgenüsse, sportliche Unternehmungen, Flachwitze, kompetentes Korrekturlesen und aufbauende Worte, wann immer es notwendig war! Ihr seid immer herzlich Willkommen im „Sporthotel Wolf“.

Euch, Rika und Karl sowie Nora und Ralph möchte ich für spontane Kucheneinladungen, Ausflüge mit Schokolade, Segelbooten oder Renovierungsarbeiten, Korrekturen und Diskussionen über Gott und die Welt danken. Vielen Dank, dass alles mit Euch so schön unkompliziert und entspannt ist.

Riesengroßer und eigentlich nicht in Worte zu fassender Dank gebührt meiner Familie. Danke für Eure Liebe, Euren Rückhalt und dafür, dass Ihr IMMER da seid – sogar, wenn mal „die Emulsionen hochkochen“. Ausgesprochen dankbar bin ich auch meiner Oma – ohne Dich und Deinen Zuspruch wäre ich nicht da, wo ich bin.

Und natürlich Dir, Karl – für Alles!





# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Problemstellung und Zielsetzung .....</b>                     | <b>2</b>  |
| <b>3</b> | <b>Theoretische Grundlagen.....</b>                              | <b>5</b>  |
| 3.1      | Mikroalgen.....  | 5         |
| 3.1.1    | Merkmale von Mikroalgen .....                                    | 5         |
| 3.1.2    | Klassifizierung von Mikroalgen.....                              | 6         |
| 3.1.3    | <i>Dunaliella salina</i> .....                                   | 7         |
| 3.1.4    | Industrielle Nutzung von Mikroalgen.....                         | 9         |
| 3.1.5    | Photobioreaktoren .....  | 10        |
| 3.2      | Photoautotropher Metabolismus.....                               | 12        |
| 3.2.1    | Photosynthese.....   | 12        |
| 3.2.2    | Carotinoidbiosynthese .....                                      | 20        |
| 3.2.3    | Einflussfaktoren auf den Metabolismus.....                       | 22        |
| 3.3      | Modellierung des phototrophen Wachstums .....                    | 30        |
| 3.3.1    | Phototrophes Wachstum im Satzprozess.....                        | 31        |
| 3.3.2    | Lichtabschwächung in Photobioreaktoren.....                      | 34        |
| 3.4      | Extraktion von $\beta$ -Carotin aus Mikroalgen .....             | 36        |
| 3.4.1    | Zellaufschluss .....   | 37        |
| 3.4.2    | Flüssig-Flüssig-Extraktion .....                                 | 37        |
| 3.4.3    | Zentrifugalextraktion.....                                       | 39        |
| <b>4</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                                | <b>43</b> |
| 4.1      | Mikroorganismen .....  | 43        |
| 4.2      | Kultivierung von Mikroalgen .....                                | 43        |
| 4.2.1    | Verwendete Medien .....  | 43        |
| 4.2.2    | Stammhaltung .....   | 44        |
| 4.2.3    | Vorkulturherstellung in Schüttelkolben .....                     | 44        |
| 4.2.4    | Vorkulturherstellung in Blasensäulenreaktoren .....              | 45        |
| 4.2.5    | Satzprozesse in Flachplatten-Photobioreaktoren .....             | 46        |
| 4.2.6    | Satzprozesse in Flachgerinnereaktoren .....                      | 50        |
| 4.3      | Extraktion im Zentrifugalextraktor .....                         | 53        |
| 4.4      | Methoden für die Modellierung des phototrophen Wachstums .....   | 54        |
| 4.4.1    | Bestimmung von Eingangspotonenflussdichte und Transmission ..... | 55        |
| 4.4.2    | Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten.....        | 55        |
| 4.4.3    | Bestimmung der mittleren integralen Photonenflussdichte.....     | 56        |
| 4.5      | Analytische Methoden.....  | 59        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 4.5.1    | Bestimmung der optischen Dichte .....   | 59         |
| 4.5.2    | Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....  | 60         |
| 4.5.3    | Bestimmung der Salinität .....  | 60         |
| 4.5.4    | Extraktion von Carotinoiden .....   | 61         |
| 4.5.5    | Bestimmung der Gesamtcarotinoidkonzentration.....   | 61         |
| 4.5.6    | Spektralphotometrischer Nachweis von $\beta$ -Carotin .....                                     | 62         |
| 4.5.7    | Quantitativer Nachweis von Lutein und $\beta$ -Carotin.....                                     | 62         |
| <b>5</b> | <b>Charakterisierung von <i>D. salina</i> CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren .....</b> | <b>64</b>  |
| 5.1      | Auswahl eines <i>Dunaliella</i> -Stammes zur Produktion von $\beta$ -Carotin .....              | 64         |
| 5.2      | Satzprozesse bei unterschiedlichem pH .....   | 71         |
| 5.3      | Satzprozesse bei unterschiedlichen Temperaturprofilen .....                                     | 73         |
| 5.4      | Satzprozesse bei verschiedenen Salzprofilen .....   | 76         |
| 5.5      | Satzprozesse mit unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzung.....                                | 79         |
| 5.6      | Einfluss der Lichtverfügbarkeit auf Wachstum und $\beta$ -Carotin-Bildung .....                 | 82         |
| 5.7      | Zweistufige Satzprozesse.....   | 90         |
| <b>6</b> | <b>Untersuchungen mit <i>D. salina</i> CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren.....</b>              | <b>94</b>  |
| 6.1      | Satzprozesse in Flachgerinnereaktoren.....  | 94         |
| 6.2      | Satzprozesse mit verschiedenen Pumpentypen.....   | 98         |
| 6.3      | Satzprozesse bei Zugabe scherprotektiver Agenzien .....   | 101        |
| <b>7</b> | <b>Extraktion von <math>\beta</math>-Carotin aus Algenbiomasse.....</b>                         | <b>107</b> |
| 7.1      | Identifikation eines geeigneten Lösemittels.....  | 107        |
| 7.2      | Einfluss des Zellaufschlusses auf die Extraktion .....  | 108        |
| 7.3      | Extraktion im Zentrifugalextraktor .....  | 111        |
| <b>8</b> | <b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>9</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>123</b> |
|          | <b>Symbol- und Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>141</b> |
|          | <b>Anhang.....</b>  | <b>144</b> |
| A.1.     | Dissoziationskonstanten .....   | 144        |
| A.2.     | Geräte.....   | 144        |
| A.2.1.   | Blasensäulenreaktoren .....   | 144        |
| A.2.2.   | Flachplatten-Photobioreaktoren .....  | 145        |
| A.2.3.   | Flachgerinnereaktoren.....  | 147        |
| A.2.4.   | HPLC.....   | 147        |
| A.3.     | Allgemeine Geräte .....   | 148        |
| A.4.     | Chemikalien .....   | 148        |







# 1 Einleitung

Der anthropogene Treibhauseffekt beschreibt die durch den Menschen verursachte Veränderung des Klimas. Besonders hervorzuheben ist dabei die erhöhte Freisetzung verschiedener Treibhausgase, die mit Einsetzen der Industrialisierung begann. Verglichen mit der Luftzusammensetzung vor der Industrialisierung 1750 war beispielsweise der CO<sub>2</sub>-Anteil im Jahr 2018 um etwa 47 % höher (World Meteorological Organization, 2019). Um eine weitere Klimaerwärmung zu verhindern, ist eine Reduktion der CO<sub>2</sub>-Emissionen unabdingbar (Umweltbundesamt, 2020). Dazu müssen bestehende Prozesse effizienter und neue Prozesse CO<sub>2</sub>-neutral gestaltet werden (Schenk *et al.*, 2008). Um den Einsatz fossiler Ressourcen zu verringern, ist die Nutzung von Mikroalgen ein vielsprechender Ansatz, da sie in der Lage sind, das Treibhausgas CO<sub>2</sub> als Kohlenstoff- und Sonnenlicht als Energiequelle zu nutzen (Chiu *et al.*, 2008; Karube *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). Diese nachhaltige Herstellung von Mikroalgen oder deren Produkte kann in passenden Klimazonen über das gesamte Jahr hinweg stattfinden (Quinn *et al.*, 2011). Darüber hinaus kann die Kultivierung auf nicht urbaren Flächen durchgeführt werden, wodurch verglichen mit Ölpflanzen eine Konkurrenz im Rahmen des „Teller-Tank-Konflikts“ vermieden wird (Hannon *et al.*, 2010). Weitere Vorteile gegenüber den meisten Pflanzen sind die Trinkwassereinsparung durch die Nutzbarmachung von Salz- oder Abwasser (Cantrell *et al.*, 2008; Wijffels & Barbosa, 2010) sowie ihre höheren Solarenergieausbeuten (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010; Tredici, 2010).

Neben diesen energie- und umweltbezogenen Gründen weisen Produkte aus Mikroalgen zusätzlich Vorteile in ihren Eigenschaften auf. Beispielsweise ist die chemische Synthese des Pigments  $\beta$ -Carotin zwar möglich (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018), bei natürlich hergestelltem  $\beta$ -Carotin ist allerdings die antioxidative Kapazität höher (Chidambara Murthy *et al.*, 2005). Bereits 2015 betrug der globale Marktwert von  $\beta$ -Carotin 432,2 Millionen US-Dollar, von denen 164,2 Millionen US-Dollar auf  $\beta$ -Carotin aus Mikroalgen entfielen (Grand View Research, 2016).  $\beta$ -Carotin kann sehr vielseitig als Farbstoff, Futter- und Lebensmittelzusatzstoff genutzt werden oder könnte als Vorläufermolekül für Additive in Flugzeugkraftstoffen Anwendung finden (Chidambara Murthy *et al.*, 2005; Dufossé *et al.*, 2005; Woortman *et al.*, 2020). Da  $\beta$ -Carotin von Mikroalgen intrazellulär produziert wird und daher ein Aufschluss sowie eine Extraktion der Biomasse notwendig wird, ist eine effiziente Herstellung in günstigen Produktionssystemen und eine einfache Gewinnung von  $\beta$ -Carotin notwendig, um die Wertschöpfung des Gesamtprozesses zu gewährleisten.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Mikroalgen können photoautotroph eine breite Palette an Wertstoffen produzieren. Daher stellen sie eine nachhaltige Alternative zu oftmals energieaufwendigen chemischen Herstellungsverfahren dar. Gerade die Verwendung von Lipiden aus Mikroalgen als Rohstoff zur Treibstoffherstellung ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt (Posten & Walter, 2012). Da Lipide aus Mikroalgen allerdings bezogen auf die Herstellungskosten eine niedrige Wertschöpfung aufweisen, ist die Nutzbarmachung hochwertiger intrazellulärer Mikroalgenprodukte sinnvoll. Zu diesen zählen beispielsweise Carotinoide, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Polysaccharide, Vitamine und Proteine (Chmiel & Weuster-Botz, 2018; Michalak & Chojnacka, 2015; Posten & Walter, 2012). Um Mikroalgenprozesse grundsätzlich ökonomisch konkurrenzfähiger gestalten zu können, ist es wichtig, Produktionskosten zu reduzieren.

Der halotolerante Algenstamm *Dunaliella salina* ist für die Produktion von  $\beta$ -Carotin bekannt und wird in großen Salzseen oder in durch Schaufelräder durchmischten *Raceway Ponds* kultiviert (Ben-Amotz, 1999). Freilandkultivierungen unterliegen dynamischen Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Es treten über den Tag hinweg Variationen der Temperatur sowie des Lichteintrags auf. Zusätzlich bestimmen die Jahreszeiten ebenfalls die täglichen Licht- und Temperaturverläufe. Die üblicherweise mit Feuchtigkeit ungesättigte Luft in Verbindung mit auftretendem Wind und hohen Temperaturen führt zur Verdunstung von Wasser und dadurch zu einem Anstieg der Salinität im Reaktor. Bisher werden jedoch die meisten Studien im Labormaßstab mit *D. salina* unter konstant gehaltenen Prozessbedingungen (Licht, Temperatur, Salinität) durchgeführt (Khadim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; Morowvat & Ghasemi, 2016; Roopnarain *et al.*, 2014; Wongsnansilp *et al.*, 2016). Daher war die erste Zielsetzung dieser Arbeit die Charakterisierung von *D. salina*-Stämmen im Hinblick auf Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion unter typischen Klimabedingungen (Tag-Nachtganglinien von Temperatur und Licht).

Um definierte Reaktionsbedingungen zu gewährleisten, ist die Nutzung geschlossener Photobioreaktoren sinnvoll. Um den täglichen Lichtverlauf nachzustellen, ist die steuerbare Beleuchtung des Photobioreaktors mit Leuchtdioden, deren Spektrum dem von Sonnenlicht ähnelt, notwendig. Zusätzlich ist eine Temperierung wichtig, um Tagesganglinien der Temperatur realitätsgetreu abzubilden. Daher werden geschlossene Flachplatten-Photobioreaktoren mit steuerbarem Lichteintrag und Temperaturregelung verwendet, deren Begasung und Durchmischung nach einem *gas lift*-Verfahren mit innerem Umlauf stattfindet.

Die Herstellung von *D. salina* in Salzseen oder *Raceway Ponds* findet bei hohen Schichtdicken von etwa 30 cm statt. Eine daraus resultierende Herausforderung liegt in der geringen Lichtverfügbarkeit in der

Mikroalgensuspension, durch die nur niedrige Biomassekonzentrationen zwischen  $0,33-1,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht werden (Borovkov *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). Eine Alternative zu *Raceway Ponds* stellen offene Photobioreaktoren mit einer deutlich verringerten Schichtdicke dar. Im am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München entwickelten Flachgerinnereaktor (Apel, 2017) wird die Zellsuspension durch eine Kreiselpumpe in ein Becken gefördert, aus dem sie schwerkraftgetrieben über zwei Gerinne läuft. Die Beleuchtung der Flachgerinnereaktoren findet durch eine Kombination von Sonnenlicht und LED-Beleuchtung statt. Die Temperierung der Zellsuspension wird durch die Temperatur der Raumluft beeinflusst. So können typische Klimabedingungen (Tagesganglinien) angewendet werden. Die Dimensionierung und Neigung der Gerinne in Verbindung mit dem geförderten Reaktionsvolumen führt zu einer Schichtdicke der Algensuspension von 0,6 cm, die es bereits erlaubte, sehr hohe Biotrockenmassekonzentrationen von  $> 50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  mit einem *Nannochloropsis salina*-Stamm zu erzielen (Apel *et al.*, 2017). Mit diesem Mikroalgenstamm konnte zudem die Übertragbarkeit von Prozessen aus Flachplatten-Photobioreaktoren in offene Flachgerinnereaktoren gezeigt werden (Pfaffinger, 2017; Pfaffinger *et al.*, 2019). Im Gegensatz zu dem erfolgreich in Flachgerinnereaktoren kultivierten Mikroalgenstamm *N. salina* (2-4  $\mu\text{m}$ ) ist *D. salina* mit 5-29  $\mu\text{m}$  größer und besitzt keine Zellwand (Borowitzka & Siva, 2007; Oliveira *et al.*, 1980). *D. salina* kann durch die fehlende Zellwand als scherempfindlicher Mikroalgenstamm eingeordnet werden (Kokkinos *et al.*, 2016; Michels *et al.*, 2016).

Da es bisher keine Literaturdaten zum Wachstum von *D. salina* in Flachgerinnereaktoren gibt, war die zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit die Maßstabsübertragung von Flachplatten-Photobioreaktoren in Flachgerinnereaktoren zur Herstellung von *D. salina*. Dazu werden vergleichbare Satzprozesse in beiden Reaktortypen bei Tagesganglinien (Licht, Temperatur) durchgeführt.

Die Aufarbeitung von Mikroalgenbiomasse zur Gewinnung intrazellulär produzierter Stoffe wie  $\beta$ -Carotin stellt bei Bioprozessen einen großen Kostenpunkt dar. Unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Extraktion von  $\beta$ -Carotin mit Lösemitteln aus *D. salina*-Biomasse sind bereits bekannt. Zur Extraktion werden sowohl schwer verdampfbare Pflanzenöle (Nonomura, 1987; Rose *et al.*, 1994) als auch nicht mit Wasser mischbare organische Lösemittel (Rüegg, 1984) in aufwendigen Prozessen verwendet. Die Algenbiomasse liegt in den etablierten Extraktionsprozessen meist stark konzentriert oder getrocknet vor (Nonomura, 1987; Rüegg, 1984). Soll Chlorophyll entfernt werden, wird eine Vorbehandlung der Biomasse mit Calciumhydroxid bei Inertgasatmosphäre unter Erhitzen durchgeführt. Nach einem anschließenden Filtrationsschritt kann der Filtrationsrückstand getrocknet werden, um Wasserreste zu entfernen. Die Extraktion erfolgt im Anschluss mit einem organischen Lösemittel aus dem getrockneten Rückstand (Rüegg, 1984). Wird die Konzentrierung der Biomasse durch Flokkulation angestrebt, werden Koagulationsmittel zugegeben. Die Entfernung des Koagulationsmittels findet durch Azidifizierung und Erhitzen statt. Gleichzeitig wird das pflanzliche Öl

als Lösemittel zugegeben. Durch Homogenisation wird eine Emulsion zur Extraktion gebildet. Als weitere Schritte werden eine Neutralisierung und Kühlung der Emulsion durchgeführt. Das Öl mit den darin enthaltenen Carotinoiden wird abschließend durch Zentrifugation gewonnen (Nonomura, 1987). Eine Möglichkeit, Prozessschritte zu vermeiden, ist die direkte Extraktion aus Mikroalgensuspension. Diese wurde mit Pflanzenöl durchgeführt, wobei eine Erhitzung zur Steigerung der  $\beta$ -Carotin-Löslichkeit im Öl und der Lyse der Zellen genutzt wurde. Eine anschließende Ultrafiltration wurde zur Trennung des Öls mit den darin enthaltenen Stoffen von der wässrigen Lösung angewendet (Rose *et al.*, 1994). Die Verwendung von Pflanzenöl erschwert die Rückgewinnung des Lösemittels stark. Zudem werden bei den bisher bekannten Extraktionsverfahren energieaufwendige Schritte wie Erhitzen der gesamten Zellsuspension oder Trocknung genutzt. Der hohe Energieaufwand für die Trocknung von Biomasse kann alleine bis zu 30 % der Gesamtkosten an der Produktion von Mikroalgen ausmachen (Tiburcio *et al.*, 2007).

Daher wird als dritte Zielsetzung die direkte Extraktion von  $\beta$ -Carotin aus einer wässrigen *D. salina*-Suspension untersucht. Wichtige Anforderungen an das verwendete Lösemittel sind eine schlechte Mischbarkeit mit Wasser und eine gute Rückgewinnbarkeit. Bei der Extraktion wird aufgrund des hohen Energieaufwands auf Erhitzen und Trocknung verzichtet.

## 3 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über Aufbau, Merkmale und Stoffwechselwege von Mikroalgen sowie deren Klassifizierung. Zusätzlich werden Anpassungsmechanismen von Mikroalgen bei verschiedenen möglichen Einflussfaktoren beschrieben und wie das Wissen darüber bei der industriellen Kultivierung von Mikroalgen genutzt werden kann. In diesem Zusammenhang werden auch Modellierungsansätze zur Beschreibung von phototrophem Wachstum zusammengefasst. Abschließend werden Grundlagen zur Gewinnung von Produkten aus Mikroalgenbiomasse dargelegt.

### 3.1 Mikroalgen

Als Algen werden im Allgemeinen photosynthetisch aktive Organismen bezeichnet, denen im Gegensatz zu Pflanzen eine Differenzierung in Wurzeln, Blätter und Stamm fehlt (Gualtieri & Barsanti, 2006). Es kann zwischen bis zu mehreren Metern langen Makroalgen und ein- oder mehrzelligen Mikroalgen unterschieden werden.

#### 3.1.1 Merkmale von Mikroalgen

Die zahlenmäßig am häufigsten vertretenen Mikroalgen sind in der Lage, in unterschiedlichen Lebensräumen zu leben. Sie besiedeln überwiegend Süß-, Salz- und Brackwasser, können teilweise aber auch Eis, heiße Quellen, Böden oder Felsen besiedeln. Zudem finden sich Mikroalgen oftmals in Symbiosen wie beispielsweise Flechten wieder (Borowitzka, 2007; Lee, 2008). Mikroalgen sind üblicherweise zwischen 3 und 10  $\mu\text{m}$  groß und liegen einzellig oder filamentös vor (Rosello Sastre, 2012). Ihre Form variiert stark und kann amöboid, capsal, kokkenähnlich, begeißelt oder sarkinoid sein (Andersen, 2013). Zusätzlich gibt es motile und nicht-motile Formen (Borowitzka, 2007).

Auch der Aufbau von Mikroalgen variiert stark. Es gibt sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Mikroalgen. Der Aufbau der prokaryotischen Cyanobakterien ähnelt dem von Bakterien stark (Lee, 2008). Der komplexere Aufbau eukaryotischer Mikroalgen lässt auf einen evolutiv längeren Entwicklungszeitraum schließen (Andersen, 2013). Die Endosymbiontentheorie beschreibt einen Entwicklungsprozess, bei dem ein phagozytischer Eukaryot ein Cyanobakterium aufnahm und dieses als Organell nutzte (Lee, 2008). Das Organell, in dem auch die Photosynthese stattfindet, wird Chloroplast genannt. Neben diesem Hauptorganell besitzen eukaryotische Mikroalgen zusätzlich Mitochondrien, Zellkern, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum sowie Vakuolen. Die intrazellulär liegenden Organellen sind von Zellwänden aus Cellulose umgeben, die zusätzlich verkalkt, verkieselt, proteinös oder organisch verstärkt sein können (Borowitzka, 2007). Die Fortbewegung wird durch Lichtunterschiede am Augenfleck – dem Stigma – gesteuert und durch Rotation der Flagellen ausgeführt (Andersen, 2013). Die Vermehrung von Mikroalgen erfolgt vegetativ durch Zellteilung oder

Fragmentierung einer Kolonie, asexuell durch die Produktion von Sporen oder sexuell (Gualtieri & Barsanti, 2006).

Wachstum und Vermehrung von Mikroalgen können bei Anwendung unterschiedlicher Arten der Energiegewinnung stattfinden. Für heterotrophes Wachstum müssen alle Nährstoffe im Medium bereitgestellt werden, allerdings gibt es nur wenige obligat heterotrophe Algen. Werden nur einige wenige organische Stoffe benötigt, wird das Wachstum photoauxotroph genannt. Die interessanteste Stoffwechselform für nachhaltige Prozesse ist die Photoautotrophie. Hier wird außer anorganischen Nährstoffen nur Licht und CO<sub>2</sub> benötigt, um alle Zellbestandteile herzustellen. Eine Mischform ist die Mixotrophie, bei der sowohl CO<sub>2</sub> assimiliert werden kann, als auch organische Stoffe zum Zellaufbau genutzt werden können (Borowitzka, 2007).

### 3.1.2 Klassifizierung von Mikroalgen

Historisch bedingt wurde die Einteilung von Mikroalgen anhand von ultrastrukturellen Unterschieden festgemacht, die durch Lichtmikroskopie identifiziert werden konnten (Andersen, 2013). Zu den Hauptkriterien der Klassifizierung zählten unter anderem die verschiedenen akzessorischen Pigmente, bei der Photosynthese aufgebaute Speicherstoffe, der Aufbau der Zellwand, das Vorhandensein sowie der Aufbau der Begeißelung und verschiedene weitere biochemische Merkmale (Gualtieri & Barsanti, 2006; van den Hoek *et al.*, 1993).

Cyanobakterien zählen zu den prokaryotischen Mikroalgen und sind näher mit Bakterien verwandt als mit eukaryotischen Mikroalgen (Lee, 2008). Genau wie Bakterien fehlen ihnen Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum (van den Hoek *et al.*, 1993). Als akzessorische Pigmente besitzen sie Chlorophyll *a*, Phycobiliproteine und das Speicherprodukt Glykogen. Die Zellwände entsprechen der von Gram-negativen Bakterien und enthalten meist Aminozucker und Aminosäuren (Lee, 2008). Ihre Thylakoide (Membranstrukturen, in denen die Lichtreaktionen der Photosynthese stattfinden) sind einzeln in gleichem Abstand voneinander angeordnet (van den Hoek *et al.*, 1993). Die Einteilung der einzelnen Gruppen innerhalb der Cyanobakterien nach morphologischen Aspekten spiegelt keine monophyletische Einteilung wider (Andersen, 2013).

Die eukaryotischen Mikroalgen können in weitere 9 Abteilungen gegliedert werden. Dazu zählen Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta sowie Chlorophyta. Eine weitere Unterteilung kann in Klassen erfolgen (van den Hoek *et al.*, 1993).

Die Entstehung der Archaeplastida, die Glaucophyta, Rhodophyta und Chlorophyta zusammenfasst, ist auf eine primäre Endosymbiose zurückzuführen. Hierbei wird von der Aufnahme eines Cyanobakteriums durch einen heterotrophen Eukaryoten ausgegangen. Diese Annahme wird durch das Bestehen von zwei Hüllmembranen um die Plastiden gestützt. Im Falle einer zweiten Endosymbiose nimmt ein Eukaryot eine eukaryotische Mikroalge auf und übernimmt deren Plastide. Die Plastide dieser Abteilungen weisen drei bis vier Membranen auf (Friedl *et al.*, 2012).

Als Beispiel für eukaryotische Mikroalgen wird im Folgenden auf die Abteilung der Chlorophyta eingegangen. Die sogenannten Grünalgen sind überwiegend Süßwasseralgen, nur etwa 10 % leben in Salzwasser (Lee, 2008). Innerhalb von 500 Gattungen gibt es etwa 8000 Arten in dieser Abteilung (van den Hoek *et al.*, 1993). Sie nutzen Chlorophyll *a* und *b* als akzessorische Pigmente für die Photosynthese und können die Carotinoide  $\beta$ -Carotin und verschiedene Xanthophylle zum Schutz vor hoher Lichteinstrahlung bilden (Friedl *et al.*, 2012). Das Speicherprodukt Stärke wird im Chloroplast gebildet, nicht im Cytoplasma wie bei anderen Algen (Lee, 2008). Die Thylakoide in den Chloroplasten liegen gestapelt als Grana oder Pseudograna vor (van den Hoek *et al.*, 1993). Die Zellwand besteht zumeist aus dem Polysaccharid Cellulose (Lee, 2008).

### 3.1.3 *Dunaliella salina*

Die Art *D. salina* gehört zur Gattung *Dunaliella*, die der Familie Dunaliellaceae angehört. Wie andere freilebende, einzellige oder koloniebildende begeißelte Chlorophyten wird sie zur Ordnung Volvocales gezählt (Borowitzka & Siva, 2007). Volvocales sind im Allgemeinen von einer Glykoproteinwand ohne Cellulose umgeben. Bei einigen Vertretern sind allerdings nur noch Reste von der Glykoproteinwand vorhanden (van den Hoek *et al.*, 1993). Dazu zählt ebenfalls *D. salina*. Statt einer Zellwand kann eine Hüllschicht aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykolipiden, die Glykokalyx, auftreten (Borowitzka & Siva, 2007; Oliveira *et al.*, 1980). Die Form der Zellen variiert stark zwischen kugelförmig, ellipsoid bis ei- und birnenförmig. Die beweglichen Zellen besitzen zwei Flagellen und die Thylakoide sind ungleichmäßig gestapelt. Die Zellgröße kann zwischen 5-29  $\mu\text{m}$  Länge und 4-20  $\mu\text{m}$  Breite schwanken, wobei die Länge der Flagellen der Zelllänge entspricht. Die Fortpflanzung erfolgt vegetativ oder sexuell (Borowitzka & Siva, 2007).

Im Gegensatz zu den meisten der 1000 Arten der Ordnung Volvocales ist *D. salina* halotolerant und kann Salzgehalte bis zu 300  $\text{g L}^{-1}$  überleben (Borowitzka & Borowitzka, 1990). Zwei Mechanismen helfen selbst starke osmotische Unterschiede auszugleichen (Lee, 2008). Zum einen können vermehrt Ionenpumpen gebildet werden, die durch Einlagerung in die Zellmembran intrazelluläre Ionenkonzentrationen regulieren können, wenn der osmotische Druck außerhalb der Zelle steigt (Fisher *et al.*, 1994). Zum anderen können Schwankungen des osmotischen Drucks durch die fehlende

Zellwand und die damit verbundene Flexibilität der Zelle kurzfristig mit einer Größenänderung ausgeglichen werden. Nach diesem ersten Anpassungsmechanismus wird intrazellulär Glycerin gebildet (bei Salzerhöhung) oder abgebaut (bei Salzverringern) (Lee, 2008). Je höher der Salzgehalt ist, desto mehr extrazelluläre Polymere Substanzen werden von *D. salina* als Schutz vor hohen Temperaturen und Austrocknung gebildet. Diese bestanden aus Alkylaminen und/oder zyklischen Aminen mit Polysacchariden mit den Monosacchariden Galactose, Glucose, Xylose und Fructose (Kumar *et al.*, 2018; Mishra & Jha, 2009; Mishra *et al.*, 2011).

Darüber hinaus ist *D. salina* dafür bekannt, bei hohen Salzkonzentrationen, hoher Lichtintensität und Nährstofflimitierungen  $\beta$ -Carotin akkumulieren zu können (Ben-Amotz & Avron, 1983; Borowitzka & Borowitzka, 1990; Loeblich, 1982). Die bereits beschriebene hohe Salztoleranz von *D. salina* ist bei Freilandproduktionen in offenen Bioreaktoren von Vorteil, da die meisten Organismen, die Prozesse kontaminieren könnten, entsprechende Salzkonzentrationen nicht tolerieren.

Maximal bestimmte  $\beta$ -Carotin-Gehalte in *D. salina* liegen bei bis zu 10 % an der Biotrockenmasse (Ben-Amotz & Avron, 1983; Borowitzka & Borowitzka, 1990). Stammabhängig werden verschiedene geeignete Salzkonzentrationen zur Herstellung von  $\beta$ -Carotin beschrieben. Die angegebenen Salinitäten betragen 125-250 g L<sup>-1</sup> (Ben-Amotz & Avron, 1983; Gómez *et al.*, 2003; Loeblich, 1982; Pisal & Lele, 2005; Prieto *et al.*, 2011; Tamman *et al.*, 2011).

Bei gleicher Salinität führte zudem eine Erhöhung der Eingangsphotonenflussdichte in Schüttelkolben zu einer Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts von 0,5 auf 8 % (Ben-Amotz & Avron, 1983). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Steigerung der Salinität allein für die  $\beta$ -Carotin-Anreicherung in der Zelle nicht ausreicht, sondern nur in Verbindung mit hoher Lichtstärke eine Erhöhung des  $\beta$ -Carotins auslöst (Lamers *et al.*, 2010).

Zudem spielen verschiedene Nährstoffe eine große Rolle bei der  $\beta$ -Carotin-Biosynthese. Zum Einfluss eines Stickstoffmangels gibt es verschiedene Literaturangaben. Zum einen wurde keine Veränderung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts in Abhängigkeit der Nitratkonzentration beobachtet (Ben-Amotz & Avron, 1983), zum anderen wurden Steigerungen des  $\beta$ -Carotin-Gehalts bei Nitratmangel beschrieben (Lamers *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 1998; Pisal & Lele, 2005; Saha *et al.*, 2013). Trotz einer Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts bei Stickstoffmangel wurde allerdings nicht zwingend die  $\beta$ -Carotin-Konzentration erhöht (Mojaat *et al.*, 2008).

Die höchsten berichteten  $\beta$ -Carotin-Gehalte von *D. salina* liegen bei 10 % der Biotrockenmasse und wurden in geschlossenen Rohrreaktoren (60 L) bei einer Salinität von 125 g L<sup>-1</sup> NaCl mit dem Stamm *D. salina* UTEX2538 erreicht. Die dabei ermittelte Carotinoidkonzentration lag bei 82 mg L<sup>-1</sup> (Prieto *et al.*, 2011). Da die Konzentration allerdings spektrometrisch ermittelt wurde, können die Angaben der



Gehalte aufgrund von Überlagerungen der Absorptionsspektren verschiedener Carotinoide (vgl. Abbildung 3.3) fehlerbehaftet sein.

Mit *D. salina* CCAP19/18 wurden in Satzprozessen mit Schüttelkolben bzw. Roux-Flaschen  $\beta$ -Carotinkonzentrationen von 8,6 mg L<sup>-1</sup> nach 21 d und 21 mg L<sup>-1</sup> nach 7 d unter Zugabe von Acetat und Eisensulfat erreicht (Fazeli *et al.*, 2006; Mojaat *et al.*, 2008). In einem Flachplatten-Photobioreaktor (0,8 L) wurde mit *D. salina* CCAP19/18 kontinuierlich im Turbidostat-Betrieb ein maximaler  $\beta$ -Carotin-Gehalt von 27 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> erreicht. Dazu wurde zunächst nicht-limitiert für 15 d kultiviert und im Anschluss der Zulauf durch Stickstoff-freies Medium ersetzt (Lamers *et al.*, 2012). In offenen *Raceway Ponds* wurden maximal 19-20 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin nach 7-21 d in Satzprozessen erreicht (Borovkov *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017).

#### 3.1.4 Industrielle Nutzung von Mikroalgen

Die hohe Variabilität in den Eigenschaften von Mikroalgen und die daher sehr vielseitigen Bioprodukte machen Mikroalgen zu interessanten Mikroorganismen für die Herstellung diverser Stoffe wie beispielsweise Antioxidantien, Pigmente und Lipide. Da zudem der Aspekt der Nachhaltigkeit immer weiter in den Fokus der Öffentlichkeit rückt, ist die Nutzung photoautotropher Mikroalgen zur CO<sub>2</sub>-neutralen Gewinnung von Wertstoffen interessant. Von Mikroalgen können entweder die Biomasse direkt als Futter- oder Nahrungsergänzungsmittel oder darin enthaltene Bioprodukte nach Extraktion genutzt werden (Khan *et al.*, 2018).

Mikroalgenbiomasse wird aufgrund ihrer proteinreichen Zusammensetzung vor allem als Nahrungs- oder Futtermittelzusatz verwendet. Als Ergänzung der menschlichen Ernährung wird Algenbiomasse hauptsächlich als sprüh- oder sonnengetrocknetes Pulver, tablettiert, verkapselt oder in Form von Pastillen angeboten. Bei den am weitesten verbreiteten, genutzten Stämmen handelt es sich um *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc* und *Aphanizomenon* (Pulz & Gross, 2004; Rosello Sastre, 2012). Darüber hinaus wird Algenbiomasse als direkte Nahrungsquelle beispielsweise für Fische in der Aquakultur oder zur Anreicherung von Bestandteilen der Nahrungskette verwendet (Zmora *et al.*, 2013). Aufgrund hoher Lipidgehalte von bis zu 80 % (Chisti, 2007; Thompson, 1996) können manche Mikroalgen als Kandidaten für die Produktion von Biokraftstoffen angesehen werden. Da die Produktion von Biokraftstoffen aus Mikroalgen aufgrund teurer Photobioreaktoren und aufwendiger Behandlung der Biomasse noch nicht wirtschaftlich ist, kann die Nutzbarmachung hochwertigerer Nebenprodukte in Mikroalgenbiomasse zu einer besseren Wirtschaftlichkeit führen (Barbosa & Wijffels, 2013).

Beispiele für Nebenprodukte mit hoher Wertschöpfung in Mikroalgen sind unter anderem Pigmente (z.B. Carotinoide), Sterine, Enzyme/Proteine, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie Vitamine (Khan

*et al.*, 2018). Zu den am häufigsten mit Mikroalgen hergestellten Carotinoiden zählen  $\beta$ -Carotin – ein Carotin, das mit *D. salina* produziert wird (Borowitzka, 2013) – und Astaxanthin – ein Xanthophyll, das aus *Haematococcus pluvialis* gewonnen werden kann (Han *et al.*, 2013).

### 3.1.5 Photobioreaktoren

Zur Kultivierung phototropher Mikroorganismen muss Licht als Energiequelle in die Mikroalgensuspension eingetragen werden. Photobioreaktoren, die als geschlossene sowie offene Systeme existieren, müssen darüber hinaus den Eintrag von  $\text{CO}_2$  sowie den Abtransport von Sauerstoff gewährleisten (Chmiel & Weuster-Botz, 2018). Die Nutzung geschlossener Photobioreaktoren ist zur Aufrechterhaltung klar definierter Reaktionsbedingungen unter Abgrenzung zur Umgebung und somit zur Vermeidung von Kontaminationen von Vorteil (Zittelli *et al.*, 2013). Bauformen sind Schüttelkolben, Blasensäulenreaktoren, Flachplatten-Photobioreaktoren, Rührkesselreaktoren, Plastiksäcke sowie Rohrreaktoren.

Bei Blasensäulenreaktoren erfolgt der Leistungseintrag ausschließlich durch die Dispersion von Gasblasen in der Flüssigphase – mechanisch bewegte Einbauten fehlen vollständig (Chmiel & Weuster-Botz, 2018). Im einfachsten Fall wird die Flüssigphase in einem stehenden Zylinder über den Boden gleichmäßig begast. Der Stofftransport ( $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ) erfolgt über die Phasengrenze zwischen Gas- und Flüssigphase. Der Dichteunterschied zwischen dispergierter Gasphase und Flüssigphase führt im Schwerfeld zur Durchmischung. Neben dieser einfachen Bauform gibt es außerdem Blasensäulenreaktoren mit Leitrohren. Die teilweise Begasung der Bodenfläche in Kombination mit Leitrohren führt zu einem definierten Strömungsprofil und wird als *Airlift*-Reaktor bezeichnet (Chmiel & Weuster-Botz, 2018).

Der volumetrische Leistungseintrag setzt sich bei Blasensäulen aus den Termen der Expansionsarbeit und der Blasenbildung zusammen (Chisti & Moo-Young, 1987; Weuster-Botz *et al.*, 2001) und ist in Gleichung 3.1 gezeigt. Liegen im industriellen Maßstab sehr hohe Blasensäulenreaktoren vor, kann der Term der Blasenbildung vernachlässigt werden (Weuster-Botz, 1999).

$$\frac{P}{V} = \frac{w \cdot R \cdot T}{V_M \cdot H} \cdot \ln\left(\frac{p_b}{p_0}\right) + \frac{6 \cdot w \cdot \sigma_G}{H \cdot d_B}$$

Gleichung 3.1

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\frac{P}{V}$ : | volumetrischer Leistungseintrag, $\text{W m}^{-3}$  |
| $w$ :           | Gasleerrohrgeschwindigkeit, $\text{m s}^{-1}$   |
| $R$ :           | universelle Gaskonstante, $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$                               |
| $T$ :           | Temperatur, K   |
| $V_M$ :         | molares Volumen des idealen Gases ( $22,41 \cdot 10^{-3}$ ), $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$ |
| $H$ :           | Höhe der Flüssigkeitssäule über Gaseintritt, m  |
| $p_b$ :         | Druck auf Höhe des Gaseinlasses, bar  |
| $p_0$ :         | Druck im Kopfraum, bar  |
| $\sigma_G$ :    | Grenzflächenspannung, $\text{N m}^{-1}$   |
| $d_B$ :         | mittlerer Blasendurchmesser, m  |

Entscheidend für den volumetrischen Leistungseintrag sind also die Gasleerrohrgeschwindigkeit  $w$  sowie die Höhe der Flüssigkeitssäule  $H$ . Je höher die Gasleerrohrgeschwindigkeit und je höher die Flüssigkeitssäule ist, desto höher ist der Leistungseintrag, da der Druck der Wassersäule und damit  $p_b$  mit zunehmender Höhe stark steigen.

Beim Flachplatten-Photobioreaktor handelt es sich um eine spezielle Art der Blasensäule. Hier wird eine Schicht der Algensuspension von zwei transparenten Flächen eingegrenzt, wobei die Begasung ebenfalls von unten erfolgt. Die Durchmischung der Suspension erfolgt somit auch durch Dichteunterschiede von Flüssigphase und dispergierter Gasphase.

Rohrreaktoren bestehen aus in Mäandern verlaufenden Glas- oder Kunststoffrohren mit einem Durchmesser von etwa 5 cm und sind verbreitet für die Kultivierung von Mikroalgen in geschlossenen Photobioreaktoren im Produktionsmaßstab (Tredici *et al.*, 2010). Aufgrund ihrer Länge von bis zu mehreren Kilometern kann es durch die photosynthetische Aktivität der Zellen jedoch zur Ausbildung starker Gradienten von pH und  $p\text{O}_2$  kommen. Darüber hinaus wird durch den Einsatz von Kreiselpumpen zur Aufrechterhaltung der Strömung ein hoher volumetrischer Leistungseintrag von bis zu  $500 \text{ W m}^{-3}$  erreicht. (Chmiel & Weuster-Botz, 2018)

Wegen des Kostenaufwands aufgrund teurer Materialien wie Glas sowie Schwierigkeiten bei der Maßstabsvergrößerung in geschlossenen Photobioreaktoren finden die meisten Produktionsprozesse mit Mikroalgen in offenen Photobioreaktoren statt. Bei den verschiedenen üblichen offenen Reaktoren wird zwischen passiv durchmischten Reaktoren wie großen, flachen Teichen oder Becken, und aktiv durchmischten Reaktoren, wie *Raceway Ponds* oder Rundbecken, unterschieden. Passive Durchmischung erfolgt durch Überströmung mit Luft, die aktive Durchmischung in *Raceway Ponds*

über angetriebene Schaufelräder. Alle genannten Photobioreaktoren weisen relativ hohe Schichtdicken auf, wodurch der geringe Lichteintrag zu niedrigen Biomassekonzentrationen führt. Zusätzlich stellen Kontaminationen in offenen Photobioreaktoren ein großes Problem dar, das nur durch extreme Kultivierungsbedingungen wie erhöhten pH oder erhöhte Salinität zu handhaben ist. (Borowitzka, 1999; Chmiel & Weuster-Botz, 2018; Tredici *et al.*, 2010)

Als weiterer offener Photobioreaktor werden Flachgerinnereaktoren verwendet. Durch die deutlich verringerte Schichtdicke von 6-8 mm ist die Lichtverfügbarkeit in der Zellsuspension höher, was zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen führen kann (Doucha & Lívanský, 2014). Die Berechnung des hydraulischen Leistungseintrags erfolgt in diesem Reaktortyp über die Energie, die benötigt wird, ein Fluid um eine bestimmte Höhe zu heben und kann mit Gleichung 3.2 berechnet werden.

$$\frac{P}{V} = \frac{\rho \cdot \dot{V} \cdot g \cdot \Delta H}{V} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$\frac{P}{V}$ : volumetrischer Leistungseintrag, W m<sup>-3</sup>

$\rho$ : Dichte des Fluides, kg m<sup>-3</sup>

$\dot{V}$ : Volumenstrom, m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>

$g$ : Erdbeschleunigung, m s<sup>-2</sup>

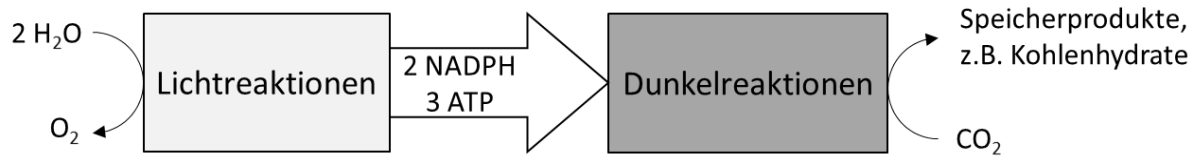
$\Delta H$ : Höhendifferenz, m

## 3.2 Photoautotropher Metabolismus

Mikroalgenstämme können zusätzlich zum photoautotrophen Stoffwechsel heterotrophe Stoffwechselwege besitzen. Da in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu CO<sub>2</sub> keine weiteren Kohlenstoffquellen genutzt wurden, wird im Folgenden nur auf den photoautotrophen Stoffwechsel eingegangen. Dabei wird zunächst der Hauptstoffwechselweg zur Energiegewinnung – die Photosynthese – beschrieben. Im Anschluss wird die Carotinoidbiosynthese genauer betrachtet. Eine Darstellung der Einflussfaktoren auf den photoautotrophen Metabolismus schließt das Kapitel ab.

### 3.2.1 Photosynthese

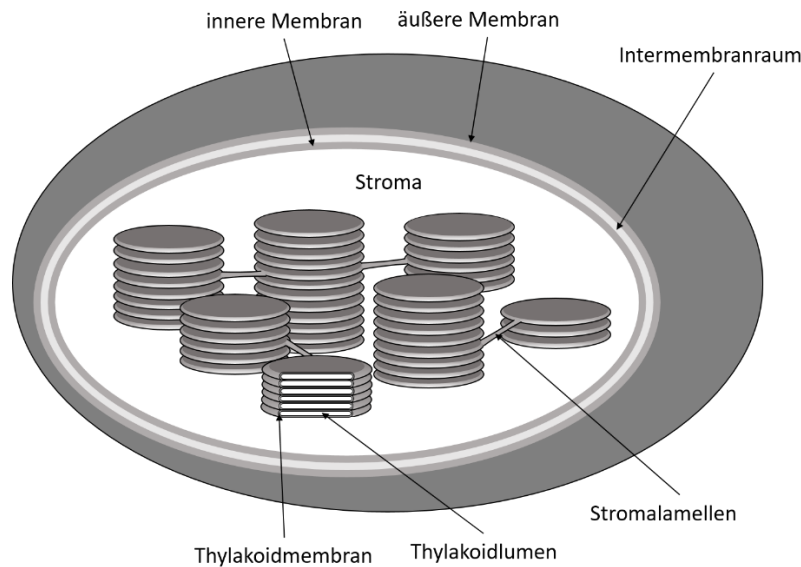
Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in Form von Photonen zur Fixierung von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) genutzt, wobei Sauerstoff freigesetzt wird. Sie gliedert sich in zwei Reaktionsschritte – die Licht- und die Dunkelreaktion, deren schematischer Ablauf und Zusammenhang in Abbildung 3.1 gezeigt sind.



**Abbildung 3.1:** Überblick über die Reaktionen der Photosynthese. In den Lichtreaktionen wird Wasser (H<sub>2</sub>O) zu Sauerstoff (O<sub>2</sub>) oxidiert. Dabei werden die Elektronen über NADPH und die Energie über ATP bereitgestellt. Beide werden in den Dunkelreaktionen genutzt, um über die Fixierung von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) die Algenbiomasse aufzubauen.

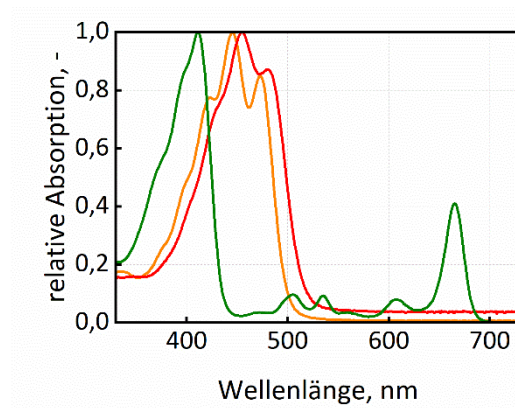
Die lichtabhängigen Reaktionen, die unter Oxidation von Wasser die chemisch gebundene Energie als ATP und die Elektronen als NADPH bereitstellen, werden Lichtreaktionen genannt. Lichtunabhängig wird im Anschluss in der Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus) unter Verwendung der zuvor bereitgestellten Transportmetabolite ATP und NADPH Kohlenstoffdioxid zu verschiedenen Zellbestandteilen fixiert (Berg *et al.*, 2018b).

Die Photosynthese findet in speziellen Organellen statt. Diese sogenannten Chloroplasten bestehen, wie in Abbildung 3.2 gezeigt, aus einer inneren und äußeren Membran mit einem dazwischen liegenden Stroma. Die im Stroma vorliegenden Thylakoide sind scheibenförmige Membranstrukturen, von denen sich mehrere stapelförmig zu einem Granum zusammenlagern können. Die Organisation von Thylakoiden in Mikroalgen findet meist in Stapeln von zwei bis drei Stück statt (Masojídek *et al.*, 2013). Die Grana sind untereinander durch Stromalamellen verbunden. An der Thylakoidmembran befinden sich alle bei der Lichtreaktion beteiligten Bestandteile wie Lichtsammelkomplexe, Reaktionszentren der Photosysteme I und II, Elektronentransportketten sowie die ATP-Synthase. Die Dunkelreaktion läuft im Stroma ab (Berg *et al.*, 2018b).



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung eines Chloroplasten. Im Inneren, dem sogenannten Stroma, befinden sich Thylakoide. Diese sind stapelförmig angeordnet, ihre Membran umschließt das innere Lumen. Die Grana sind durch Stromalamellen verbunden. Umgeben wird der Chloroplast von einer inneren und einer äußeren Membran (nach Berg *et al.* (2018b)).

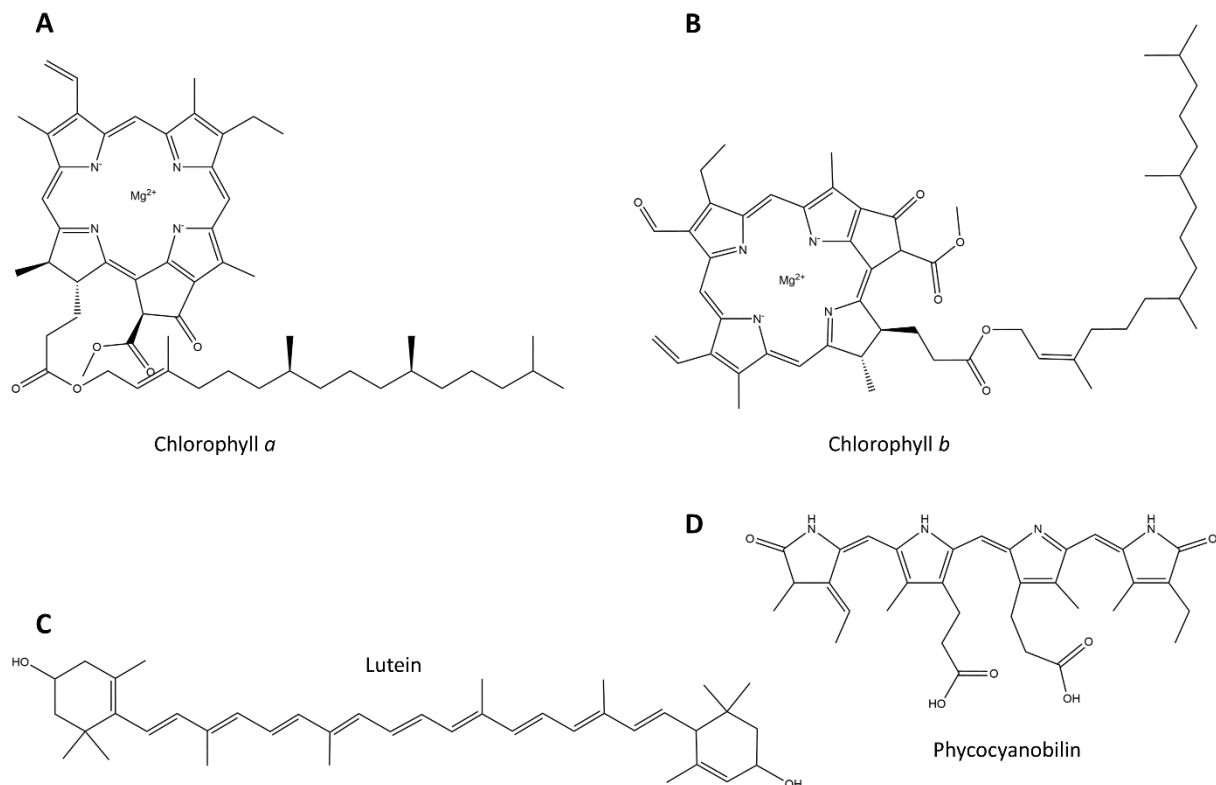
Bei höheren Pflanzen handelt es sich bei den Lichtsammelkomplexen hauptsächlich um Chlorophyll  $a$ , bei eukaryotischen Mikroalgen und Cyanobakterien können zusätzlich zu den Chlorophyllen Carotinoide und Phycobiliproteine als Antennenpigmente genutzt werden. Bei Grünalgen werden neben Chlorophyll  $a$  vor allem Chlorophyll  $b$  sowie verschiedene Xanthophylle als akzessorische Pigmente genutzt (van den Hoek *et al.*, 1993). Beispielhaft sind die Absorptionsspektren verschiedener Pigmente von Mikroalgen in Abbildung 3.3 gezeigt.



**Abbildung 3.3:** Absorptionsspektren von Chlorophyll  $a$  (grün), dem Xanthophyll Lutein (orange) und dem Carotin  $\beta$ -Carotin (rot) zwischen 330 und 730 nm (Pfaffinger, 2017).

Chlorophylle bestehen aus einem Tetrapyrrol-Ring mit zentral eingelagertem Magnesium sowie einem langkettigen Alkohol, dem Phytol. Letzterer entfällt bei Chlorophyll  $c$ . Carotinoide setzen sich aus zwei Hexacarbonringen zusammen, die über eine Kette von konjugierten Doppelbindungen verbunden sind.

Phycobiline bestehen aus vier linear verbundenen Pyrrolringen (Masojídek *et al.*, 2013). Ausgewählte akzessorische Pigmente sind in Abbildung 3.4 gezeigt.



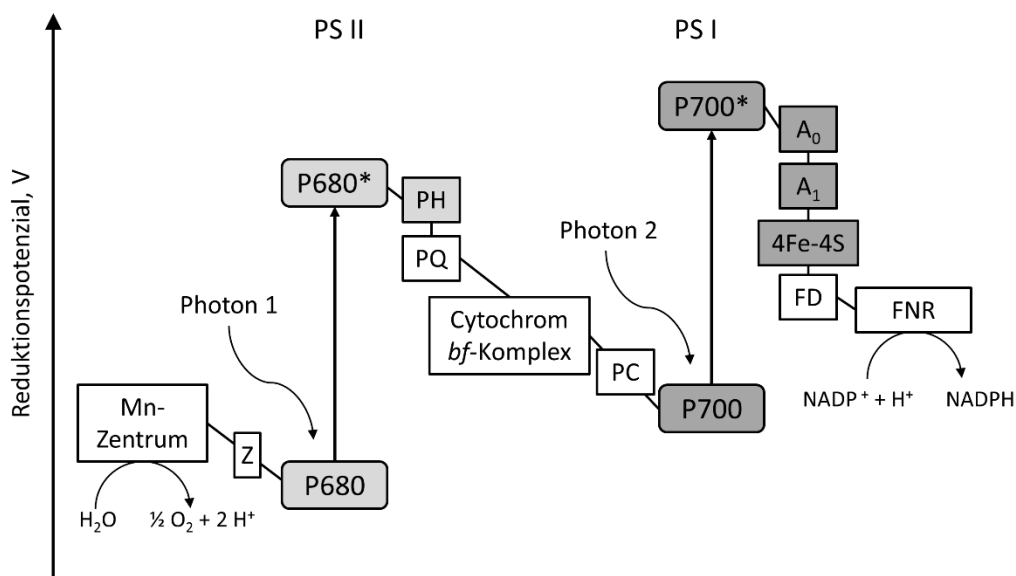
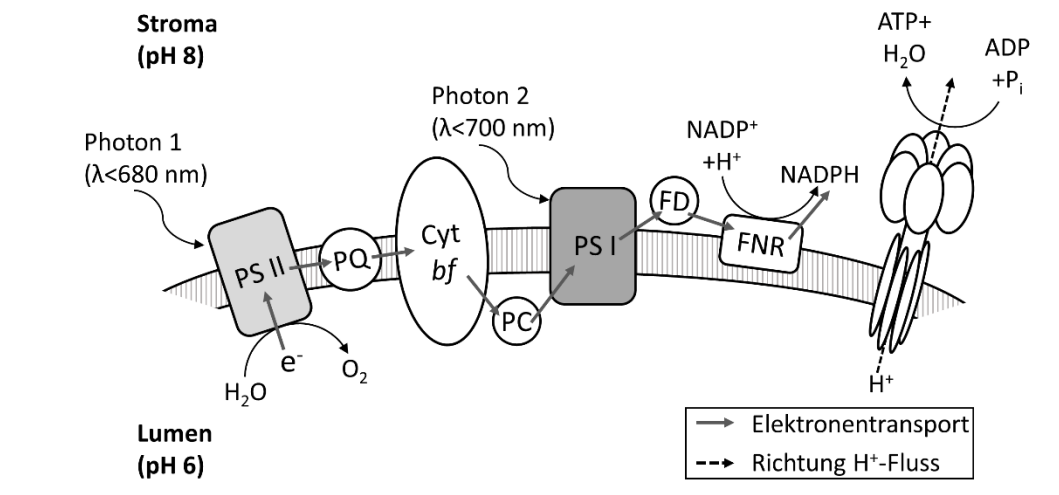
**Abbildung 3.4:** Chemische Struktur ausgewählter photosynthetisch aktiver Pigmente (Berg *et al.*, 2018b; Masojídek *et al.*, 2013). Dargestellt sind das Hauptpigment Chlorophyll *a*, ein zyklisches Tetrapyrrol (A) sowie die akzessorischen Pigmente Chlorophyll *b*, das sich durch eine Formylgruppe leicht von Chlorophyll *a* unterscheidet (B), das Xanthophyll Lutein, ein oxygeniertes Carotinoid (C) sowie Phycocyanobilin, ein aus vier linear verbundenen Pyrrolringen bestehendes Phycobilin, das kovalent an ein Protein gebunden ist (D).

Hauptaufgabe dieser Pigmente ist die Aufnahme der Lichtquanten sowie der Energietransfer zu den Reaktionszentren (Masojídek *et al.*, 2013). Der Mechanismus zur Energienutzung beruht auf photoinduzierter Ladungstrennung, die im Reaktionszentrum stattfindet, sobald ein angeregtes Elektron des speziellen Paares von einem Akzeptor aufgenommen wird. Das spezielle Paar beschreibt dabei meist zwei assoziierte Chlorophyllmoleküle, die im angeregten Zustand Elektronen übertragen (Berg *et al.*, 2018b).

### Reaktionen in Photosystem I und II

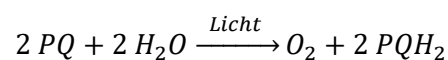
Bei Photosystem I (PS I) und Photosystem II (PS II) handelt es sich um lichtempfindliche Komplexe, die in der Thylakoidmembran gebunden sind. Sie sind durch eine Elektronentransportkette verbunden und setzen unter Aufbau von NADPH Wasser zu Sauerstoff um.

In Abbildung 3.5 oben sind diese Vorgänge schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.5:** Darstellung der lichtabhängigen Reaktionen in den Photosystemen I und II (PS I, PS II) (oben) sowie Z-Schema des Elektronentransports bei der Photosynthese (unten) (nach Berg *et al.* (2018b), Masojídek *et al.* (2013), Gualtieri & Barsanti (2006)). Bei der Oxidation von Wasser am Mangan(Mn)-Zentrum werden Elektronen freigesetzt. Dargestellt ist die Elektronentransportkette durch die Photosysteme I und II über die verschiedenen Elektronenakzeptoren. 4Fe-4S: Eisen-Schwefel-Cluster, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>: Elektronenakzeptoren von P700\*; Cyt *bf*: Cytochrom *bf*-Komplex, FD: Ferredoxin; Mn: Mangan; PC: Plastocyanin; PH: Phäophytin; PQ: Plastochinon; Z: Tyrosinrest

Das aus mehr als 20 Untereinheiten bestehende PS II wird durch Licht mit einer Wellenlänge von weniger als 680 nm angeregt. Die Gesamtreaktion des dabei stattfindenden Elektronentransports von H<sub>2</sub>O auf Plastochinon (PQ) lautet wie folgt.

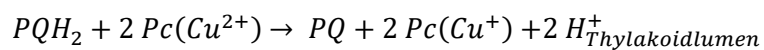


Dabei wird zunächst das spezielle Paar von Chlorophyllmolekülen P680 durch Licht mit einer Wellenlänge von 680 nm angeregt, wie ebenfalls in Abbildung 3.5 (unten) dargestellt ist. Die Nutzung



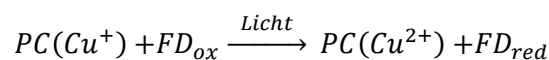
von Licht führt daher zum Ablauf der Reaktion in ein höheres Potenzial, bei der ein Elektron an Phäophytin (PH) übertragen wird. Das dem P680 fehlende Elektron wird ausgeglichen, indem dem Tyrosinrest (Z) ein Elektron entzogen wird. Das fehlende Elektron des dabei entstehenden Tyrosinradikals wird im Anschluss aus dem Mangan im wasseroxidierenden Komplex entnommen. Nach Auftreffen von vier Photonen führen die vier fehlenden Elektronen zur Oxidation von Wasser zu Sauerstoff. Die dabei freiwerdenden Elektronen dienen wiederum dem Ausgleich am entstandenen Tyrosinradikal. Von Phäophytin geht der Elektronentransfer über ein festes und ein mobiles Plastochinon weiter. Erreicht ein zweites Elektron das Plastochinon, entsteht unter Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma Plastochinol ( $PQH_2$ ). Da dies auf Seiten des Stromas stattfindet, die Reduktion von Wasser jedoch im Thylakoidlumen, baut sich ein pH-Gradient über die Thylakoidmembran auf.

Die Reaktionen des PS II sind über den Cytochrom *bf*-Komplex mit denen des PS I verbunden. Die Elektronen werden hier nach folgender Reaktion von  $PQH_2$  auf Plastocyanin (PC) übertragen.



Die dabei entstehenden Protonen werden im Thylakoidlumen frei, außerdem werden bei der Reduktion von Plastochinon mit anschließender Reoxidation zwei weitere Protonen vom Stroma ins Lumen eingebracht. Somit trägt Cytochrom *bf* ebenfalls zur Entstehung des Protonengradienten bei.

Auch im PS I kommt es zu einer photoinduzierten Ladungstrennung. Hierbei wird der Transmembrankomplex P700 von Photonen angeregt (Absorption bei einer Wellenlänge von 700 nm). Das Elektron wird über mehrere Schritte ( $A_0$ ,  $A_1$ , 4Fe-4S) auf Ferredoxin (FD) übertragen. Das übertragene Elektron wird dann dem reduzierten Plastocyanin entzogen. Die vom PS I katalysierte Gesamtreaktion wird wie folgt beschrieben.

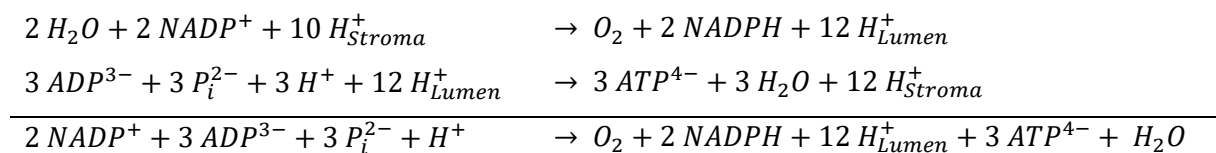


Die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) katalysiert im Anschluss durch Oxidation von  $FD_{red}$  den Aufbau von NADPH. Der an das Enzym gebundene FAD-Rest erhält zwei Elektronen von zwei Molekülen reduziertem Ferredoxin, wobei  $FADH_2$  entsteht. Im Anschluss wird ein Hydridion auf NADP<sup>+</sup> übertragen, wobei NADPH entsteht. Das bei der Reaktion beteiligte Proton wird dem Stroma entzogen, wobei erneut der Aufbau des pH-Gradienten unterstützt wird.

Der beschriebene pH-Gradient kann nur aufrechterhalten werden, weil die Thylakoidmembran nahezu undurchlässig für Protonen ist. Die daraus resultierende protonenmotorische Kraft treibt die ATP-Synthase an. Der Durchfluss von Protonen durch eine Untereinheit der ATP-Synthase beeinflusst die zweite Untereinheit, an der die Phosphorylierung von ADP stattfindet.

Zusätzlich zum beschriebenen linearen Elektronenverlauf über beide Photosysteme kann es bei einem sehr hohen Verhältnis von NADPH zu NADP<sup>+</sup> zu einem zyklischen Elektronenfluss kommen. Da NADP<sup>+</sup> dann nicht in der Lage ist, Elektronen aufzunehmen, werden diese genutzt, um die ATP-Synthase anzutreiben. Bei dieser ohne PS II stattfindenden Reaktion überträgt ein reduziertes Ferredoxin das überschüssige Elektron auf den Cytochrom-*bf*-Komplex. Im Anschluss wird Plastocyanin reduziert, welches das Elektron wieder an PS I abgibt. ATP kann dann durch den entstandenen Protonengradienten gebildet werden. Bei der zyklischen Photophosphorylierung entstehen weder NADPH noch Sauerstoff.

Die Gesamtbilanz der linearen Photophosphorylierung und ATP-Bildung kann zu folgenden Gleichungen zusammengefasst werden.

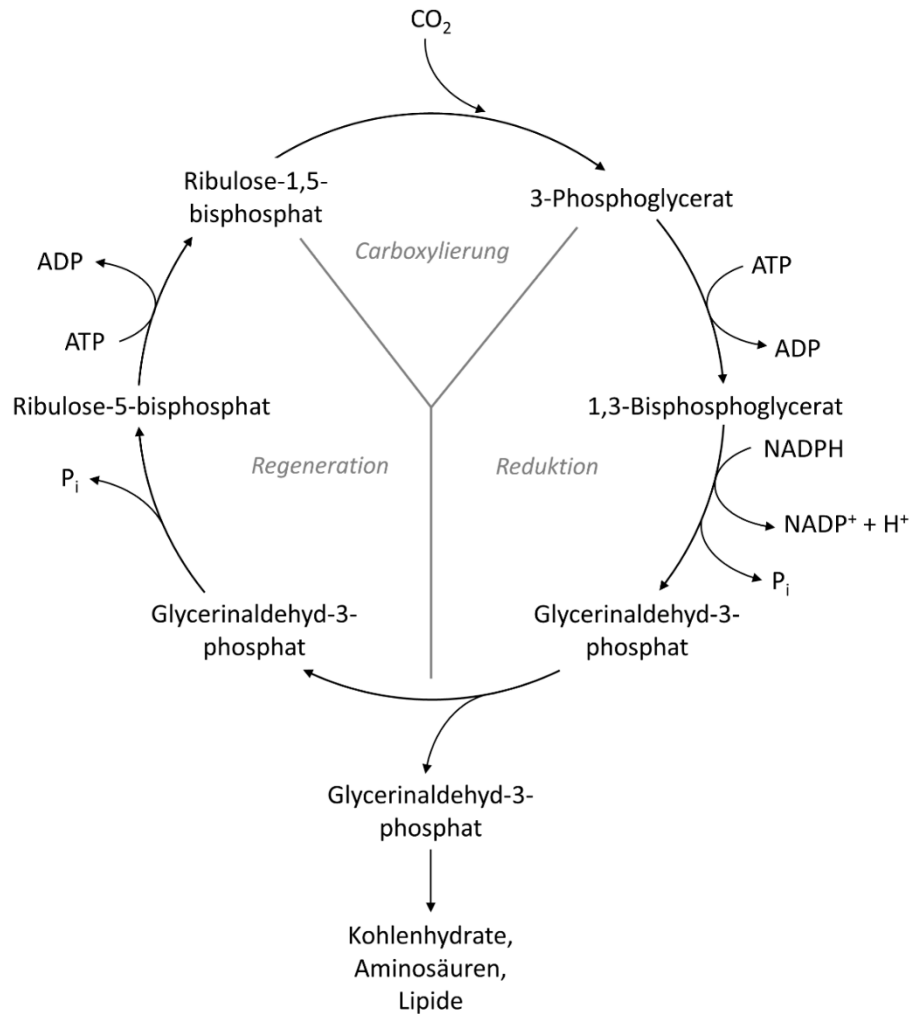


Im Gesamten betrachtet, werden beim linearen Elektronentransport der Lichtreaktionen der Photosynthese also 8 Photonen genutzt, um 2 Moleküle NADPH in den beiden Photosystemen und 3 Moleküle ATP durch den Aufbau des Protonengradienten zu erzeugen. Bezogen auf die ATP-Synthese ist der zyklische Elektronentransport etwas effizienter. Vier absorbierte Photonen führen hier zu Bildung von 8 Protonen. Die Nutzung der 8 Protonen führt zur Bildung von zwei ATP-Molekülen. Damit werden beim zyklischen Elektronentransport pro ATP zwei Photonen benötigt, beim linearen 2,7. (Berg *et al.*, 2018b; Gualtieri & Barsanti, 2006; Masojídek *et al.*, 2013)

### Die Dunkelreaktionen der Photosynthese

Um schließlich ein Molekül CO<sub>2</sub> zu fixieren, werden die zuvor in der Lichtreaktion produzierten drei Moleküle ATP und zwei Moleküle NADPH benötigt. Die dazu nötigen Reaktionen werden auch Dunkelreaktionen oder Calvin-Zyklus genannt, weil sie ohne Lichteinfluss stattfinden. Sie sind im Folgenden in Abbildung 3.6 dargestellt.

Der Calvin-Zyklus gliedert sich in drei Phasen, die Carboxylierung, die Reduktion sowie die Regeneration. In der ersten Phase wird Ribulose-1,5-bisphosphat unter Bildung einer instabilen C<sub>6</sub>-Verbindung carboxyliert. Durch Hydrolyse entstehen dabei zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat. Die stark exergonische Fixierung von CO<sub>2</sub> wird dabei von der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (Rubisco) an der Thylakoidmembran auf Stromaseite katalysiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Calvin-Zyklus.

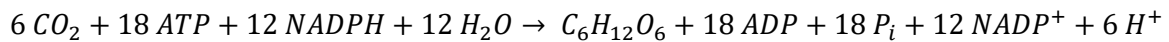


**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus (nach Berg *et al.* (2018a), Gualtieri & Barsanti (2006), Masojídek *et al.* (2013)). Die im Stroma der Chloroplasten ablaufende lichtunabhängige Reaktion kann in die drei Phasen Carboxylierung, Reduktion und Regeneration eingeteilt werden.

Während der Reduktionsphase kommt es anschließend unter Einsatz von ATP und NADPH über zwei Moleküle 1,3-Bisphosphoglycerat zur Bildung von Glycerinaldehyd-3-phosphat. Diese Reaktion wird von der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert. Im Anschluss erfolgt eine Umwandlung in die Isomere Fructose-6-phosphat, Glucose-1-phosphat sowie Glucose-6-phosphat aus dem Hexosemonophosphatpool.

Die Schwierigkeit in der Regenerationsphase besteht darin, aus C<sub>3</sub>- und C<sub>6</sub>-Kohlenhydraten C<sub>5</sub>-Kohlenhydrate aufzubauen. Dies geschieht über komplexe Reaktionen, die durch Aldolasen und Ketolasen katalysiert werden. Eine Transketolase sowie eine Aldolase katalysieren den Aufbau von Ribulose-5-phosphat. Daraus wird unter Verwendung von ATP das Ausgangsprodukt Ribulose-1,5-bisphosphat mit der Phosphoribulose-Kinase regeneriert.

Insgesamt werden also 3 Moleküle ATP und 2 Moleküle NADPH verwendet, um CO<sub>2</sub> zu fixieren. Um eine Hexose zu generieren, müssen also 6 Moleküle CO<sub>2</sub> fixiert werden. Die Gesamtbilanz des Calvin-Zyklus lässt sich also folgendermaßen darstellen.



Neben dem eigentlichen Hauptprodukt der Photosynthese, den Kohlenhydraten, kann in der Produktionsphase unter verschiedenen Bedingungen eine Vielzahl an Endprodukten wie Fettsäuren, Aminosäuren und Carbonsäuren gebildet werden. (Berg *et al.*, 2018a; Masojídek *et al.*, 2013)

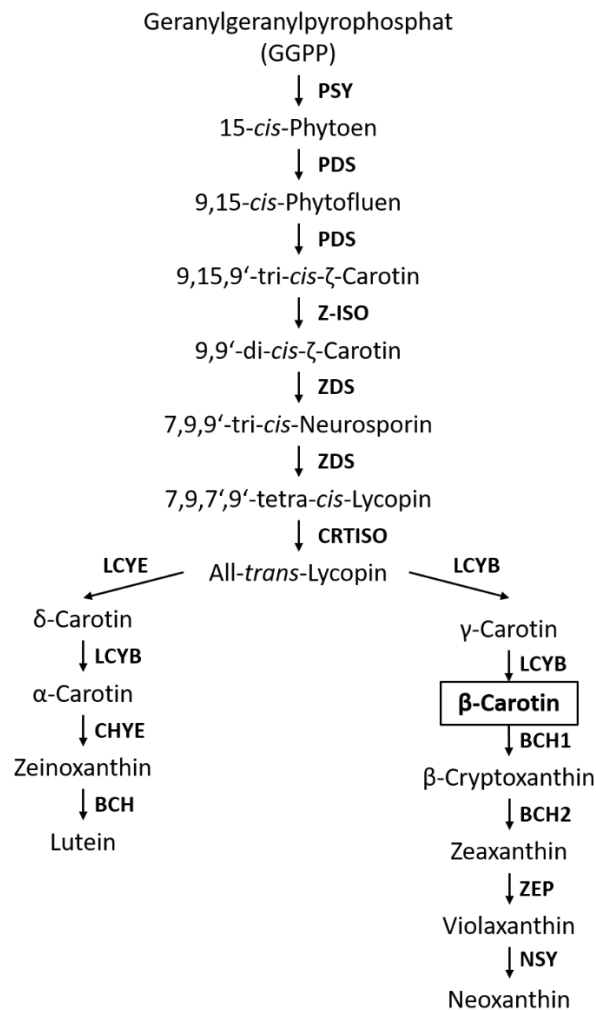
### Die Photorespiration

Die Photorespiration bezeichnet den Katabolismus von organischen Kohlenstoffverbindungen unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> und ist somit das Gegenteil der Dunkelreaktionen. Die Oxygenasereaktion wird genauso wie die CO<sub>2</sub>-Fixierung von der Rubisco katalysiert. Sie findet immer zu einem bestimmten Prozentsatz neben den Dunkelreaktionen statt, da das aktive Zentrum ebenfalls für O<sub>2</sub> zugänglich ist. Dabei entstehen 2-Phosphoglykolat und 3-Phosphoglycerat. 2-Phosphoglykolat wirkt hemmend auf Enzyme des Calvin-Zyklus und kann nur schlecht metabolisiert werden. Unter Abatmung von CO<sub>2</sub> kann es zumindest teilweise im Stoffwechsel verwertet werden. Dabei wird über die Zwischenprodukte Glykolat und Glyoxylat schließlich Glycin gebildet. In den Mitochondrien entsteht aus zwei Glycin-Molekülen unter Freisetzung eines Ammoniumions Serin. In den Chloroplasten wird Serin über verschiedene Nebenprodukte wieder zu 3-Phosphoglycerat, das dann in den Calvin-Zyklus eintritt.

Beeinflusst wird die Photorespiration vor allem von dem Verhältnis von Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid. Ein sehr hohes O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Verhältnis fördert diese Reaktion, da die Oxygenasereaktion nur in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> gehemmt wird. Um hohe Erträge bei der Biomasseproduktion von Algen zu erzielen, muss also darauf geachtet werden, dass der Effekt der Photorespiration möglichst klein gehalten wird. Erreicht wird das durch eine hohe Zufuhr von CO<sub>2</sub> sowie eine geringe Konzentration an Sauerstoff. (Berg *et al.*, 2018a; Masojídek *et al.*, 2013)

### 3.2.2 Carotinoidbiosynthese

Die Biosynthese von Carotinoiden lässt sich in drei Reaktionen gliedern – die Biosynthese von Geranylgeranylpyrophosphat, von Lycopin und die Herstellung von Carotinoiden mit Cyclohexenring. Das Ausgangsprodukt bei der Biosynthese von Carotinoiden – Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) – wird mithilfe der GGPP-Synthase aus Produkten des Methylerythritolphosphatwegs gebildet. Die beiden weiteren Reaktionen sind in Abbildung 3.7 zusammengefasst.



**Abbildung 3.7:** Ablauf der Carotinoid-Biosynthese (Alcaíno *et al.*, 2016; Rosas-Saavedra & Stange, 2016; Ye *et al.*, 2008). Die Enzyme Phytoensynthase (PSY), Phytoendesaturase (PDS), ζ-Carotin-Isomerase (Z-ISO), ζ-Carotin-Desaturase (ZDS), Carotinoidisomerase (CRTISO), ε-Lycopincyclase (LCYE), β-Lycopincyclase (LCYB), Carotinoid-ε-Hydroxylase (CHYE), Carotinoid-β-Hydroxylase (BCH), β-Carotin-Hydroxylasen (BCH1, BCH2), Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) und Neoxanthinsynthase (NSY) sind an der Biosynthese von Carotinoiden in höheren Pflanzen und Algen beteiligt.

Der erste Schritt der Biosynthese von Lycopin wird von einer Phytoensynthase (PSY) katalysiert. Dabei werden zwei GGPP zu dem 15-*cis* Isomer von Phytoen kondensiert. Im Anschluss daran wird Phytoen durch die Phytoendesaturase (PDS) doppelt entsättigt. Die dabei entstandenen Doppelbindungen werden von der ζ-Carotin-Isomerase (Z-ISO) isomerisiert. Der Einbau zweier weiterer Doppelbindungen in ζ-Carotin wird von der ζ-Carotin-Desaturase (ZDS) katalysiert. Das entstandene Isomer des Lycopins wird im Anschluss durch die Carotinoidisomerase (CRTISO) zu *All-trans*-Lycopin umgebaut. Es gibt zwei bekannte Enzyme, die die Zyklisierung der Enden von Lycopin zur Herstellung der Cyclohexenringe katalysieren. Die β-Lycopincyclase (LCYB) kann sowohl ein als auch beide Enden zyklisieren, sodass entweder γ- oder β-Carotin entsteht. Die ε-Lycopincyclase (LCYE) führt zur Zyklisierung eines Lycopin-Endes, wobei monozyklisches δ-Carotin entsteht. δ-Carotin kann durch LCYB weiter zu α-Carotin umgesetzt werden. Lutein entsteht durch die Hydroxylierung der ε- und β-

Iononringe von  $\alpha$ -Carotin durch zwei Häm-enthaltende Enzyme (Carotinoid- $\epsilon$ -Hydroxylase: CHYE, Carotinoid- $\beta$ -Hydroxylase: BCH). Die  $\beta$ -Ringe von  $\beta$ -Carotin können durch zwei  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen (BCH1, BCH2) hydroxyliert werden, wobei Zeaxanthin entsteht. Im Xanthophyllzyklus katalysiert die Zeaxanthin-Epoxidase (ZEP) die reversible Reaktion von Zeaxanthin über Antheraxanthin zu Violaxanthin. Die Rückreaktion wird durch das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase katalysiert. Die Umlagerung zu Neoxanthin erfolgt über das Enzym Neoxanthinsynthase (NSY). (Alcaíno *et al.*, 2016; Rosas-Saavedra & Stange, 2016; Ye *et al.*, 2008)

### 3.2.3 Einflussfaktoren auf den Metabolismus

Eine Beeinflussung des Stoffwechsels – und damit des Wachstums und der Bildung verschiedener Moleküle – kann sowohl von physikalischen Variablen wie der Lichtverfügbarkeit sowie der Temperatur, als auch vom Medium beeinflusst werden. Hierbei sind vor allem die Nährstoffverfügbarkeit, die Salinität und der vorliegende pH zu nennen. Darüber hinaus sind reaktorspezifische Stellgrößen wie die Schichtdicke sowie die Durchmischung der Kultur zu berücksichtigen.

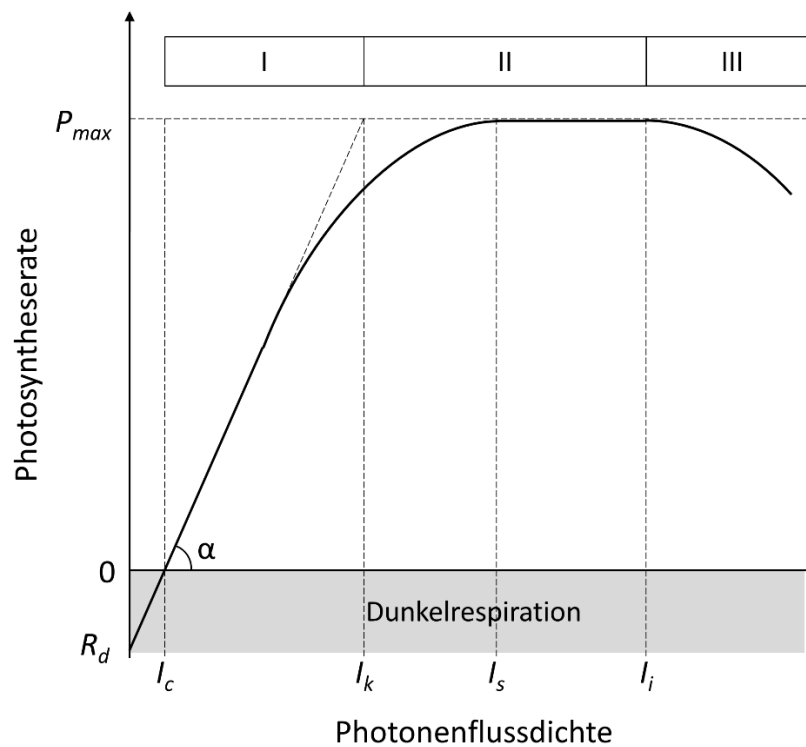
#### **Lichtverfügbarkeit**

Um Photosynthese betreiben zu können, muss der photosynthetisch aktiven Zelle – neben Kohlenstoffdioxid und Wasser – Licht als Energiequelle zur Verfügung stehen. Licht ist also ein entscheidender Einflussfaktor auf den phototrophen Metabolismus. Als Maß für Licht wird üblicherweise die Photonenflussdichte herangezogen. Diese beschreibt die Anzahl an Lichtquanten, die in einer bestimmten Zeit auf eine bestimmte Fläche treffen ( $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

In Abhängigkeit der Photonenflussdichte lässt sich die Lichtantwort photosynthetisch aktiver Organismen in drei Phasen unterteilen – Lichtlimitierung, Lichtsättigung und Photoinhibition. Graphisch zusammengefasst ergibt sich daraus die in Abbildung 3.8 gezeigte P/I-Kurve.

Während der ersten Phase führt eine Steigerung der Photonenflussdichte zu einer Erhöhung der Photosyntheserate. Bei Photonenflussdichten knapp über 0 reicht das Licht nicht, um den Erhaltungstoffwechsel abzudecken, weswegen eine negative Photosyntheserate – die sogenannte Dunkelrespiration ( $R_d$ ) – vorliegt. Der Kompensationspunkt ( $I_c$ ) stellt jene Photonenflussdichte dar, bei der die Nettoproduktion von Sauerstoff bei 0 liegt. Bei weiterer Erhöhung der Photonenflussdichte stellt sich während der Lichtlimitierung (I) ein linearer Anstieg der Photosyntheserate ein. Die Steigung  $\alpha$  entspricht dabei der maximalen photosynthetischen Effizienz. Zu Ende dieser ersten Phase beginnt durch Absinken der photosynthetischen Effizienz eine Abflachung, die dann am Übergangspunkt  $I_k$  in die zweite Phase – die Lichtsättigung (II) – mündet. Ab dem Sättigungspunkt  $I_s$  kann trotz steigender Photonenflussdichte die Photosyntheserate nicht weiter erhöht werden. Stattdessen tritt ab dem

Inhibitionspunkt ( $I_i$ ) die Phase der Photoinhibition (III) ein. Durch ein Überangebot an Photonen können Schädigungen der Photosysteme auftreten. (Grobbelaar, 2010; Richmond, 2013; Torzillo & Vonshak, 2013)



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Photosyntheserate von der Photonenflussdichte (P/I-Kurve, nach Grobbelaar (2010); Richmond (2013)). Bei sehr niedrigen Photonenflussdichten reicht die Energie nicht für den Erhaltungsstoffwechsel aus, weshalb Dunkelrespiration ( $R_d$ ) betrieben wird. Im Kompensationspunkt ( $I_c$ ) liegt die Netto-Photosyntheserate bei null. Mit steigender Photonenflussdichte wird die Phase der Lichtlimitierung (I) erreicht, in der die Photosyntheserate linear mit der Steigung  $\alpha$  zunimmt. Der Übergang von Lichtlimitierung zu Lichtsättigung (II) wird von  $I_k$  beschrieben. Am Sättigungspunkt ( $I_s$ ) wird die maximale Photosyntheserate ( $P_{max}$ ) erreicht, die konstant bleibt und erst ab dem Inhibitionspunkt ( $I_i$ ) bei Übergang in die Phase der Photoinhibition (III) sinkt.

Da Licht als Substrat den phototrophen Metabolismus stark beeinflusst, besitzen Mikroalgen vielfältige Anpassungsreaktionen auf Veränderungen der Lichtverfügbarkeit. Diese werden unter dem Begriff **Photoakklimation** zusammengefasst und zielen darauf ab, ein Gleichgewicht zwischen Licht- und Dunkelreaktionen zu erhalten (Grobbelaar, 2010). Als kurzfristige Adaptionsmechanismen, die innerhalb von Sekunden bis Minuten Wirkung zeigen (Torzillo & Vonshak, 2013), sind Zustandsübergänge der Lichtsammelkomplexe sowie die Energieabfuhr durch nicht-photochemische Prozesse bekannt (Gualtieri & Barsanti, 2006). Wird das Photosystem II bei Änderung des Lichtspektrums deutlich stärker angeregt als Photosystem I, führt eine Phosphorylierung des Lichtsammelkomplexes von PS II zu einer Umlagerung desselben an PS I (Bonaventura & Myers, 1969; Murata, 1969; Wollman, 2001). Nicht-photochemische Energieabfuhr kann beispielsweise im Xanthophyllzyklus beobachtet werden (Torzillo & Vonshak, 2013). Bei erhöhter Photonenflussdichte wurde gezeigt, dass das Xanthophyll Violaxanthin über das Zwischenprodukt Antheraxanthin zu Zeaxanthin de-epoxidiert wird

(Hager, 1967a). Die Violaxanthin-Deepoxidase wird durch einen Protonenüberschuss im Thylakoidlumen bei Lichtüberschuss aktiviert und benötigt Ascorbat als Co-Substrat (Goss & Jakob, 2010; Hager, 1969). Die Rückreaktion findet bei Lichtmangel durch die Zeaxanthin-Epoxidase katalysiert statt (Hager, 1967b). Dabei wird neben NADPH und Sauerstoff auch FAD als Co-Substrat benötigt (Büch *et al.*, 1995). Durch diese Reaktionen kann überschüssige Energie von den energiereichen Zuständen Triplet-Chlorophyll sowie Singulett-Sauerstoff aufgenommen werden und durch nicht-photochemische Löschung als Wärmeenergie abgegeben werden (Heldt & Piechulla, 2015), wodurch Inaktivierung und Schäden am Photosyntheseapparat vermieden werden (Torzillo & Vonshak, 2013).

Als längerfristige Anpassungen an verschiedene Lichtbedingungen setzen Algen Veränderungen der Pigmentzusammensetzungen ein. Bei niedrigen Photonenflussdichten werden vermehrt Chlorophyll *a* sowie weitere Antennenpigmente gebildet, um eine maximale Nutzung der eingehenden Photonen zu gewährleisten (Dubinsky *et al.*, 1986; Dubinsky & Stambler, 2009; Falkowski *et al.*, 1985). Mit der Steigerung der Pigmente geht ebenfalls eine Zunahme der Thylakoidstapel, der relativen Größe der Chloroplasten sowie eine Vergrößerung der Thylakoidoberfläche einher (Fisher *et al.*, 1998). Bei höherem Licht kehren sich diese Effekte um. Zusätzlich werden vermehrt Carotinoide gebildet, die als Schutz in Fetttröpfchen außerhalb der Chloroplasten eingelagert werden (Torzillo & Vonshak, 2013).

Reichen die Adaptionsmechanismen bei hohen Photonenflussdichten nicht aus, den Energieüberschuss zu neutralisieren, und können die resultierenden Schäden nicht mehr ausreichend schnell behoben werden, tritt **Photoinhibition** ein. Eine weit verbreitete Theorie besagt, dass durch die Reduktion von Plastochinon (Vass *et al.*, 1992) oder Ladungsverschiebungen am Photosystem II (Keren *et al.*, 1997) reaktive Sauerstoffspezies entstehen können, die direkt am PS II Schäden verursachen. Murata *et al.* (2007) postulieren jedoch unter Zusammenfassung verschiedener Studien eine Hemmung der Nachbildung verschiedener Proteine. Das bedeutet, dass Photoinhibition immer auftritt, aber erst ab einer bestimmten Menge reaktiver Sauerstoffspezies keine Nachbildung der relevanten Enzyme mehr stattfinden kann. Je nach Zellzusammensetzung können in Folge von Photoadaptation Verschiebungen in der P/I-Kurve auftreten. Die Anpassungen wirken sich dadurch direkt auf Wachstum und Biomasseausbeuten aus. (Grobelaar, 2010)

Zusätzlich zur Lichtstärke spielt auch die Frequenz von Licht-Dunkel-Zyklen eine große Rolle bei der Photosynthese. Dabei kann zwischen niedriger Frequenz im Bereich von Stunden und Tagen, mittlerer Frequenz im Bereich von Sekunden und Minuten sowie hoher Frequenz im Millisekundenbereich unterschieden werden (Grobelaar, 2010). Gerade eine sehr hohe Frequenz der Lichtverfügbarkeit (stammabhängig zwischen 0,02-100 Hz (Abu-Ghosh *et al.*, 2016)) steigert verglichen mit kontinuierlicher Bestrahlung die Effizienz der Photosynthese (Janssen *et al.*, 2001). Dieser Effekt wird auch *flashing light effect* genannt und beschreibt die Fähigkeit der Speicherung von Elektronen im



Photosystem, die bei Eintritt in eine dunkle Phase oder Zone genutzt werden können (Chmiel & Weuster-Botz, 2018).

### Temperatur

Die Temperatur kann sowohl Einfluss auf Reaktionsraten chemischer und biochemischer Prozesse nehmen, als auch die Verteilung von fixiertem Kohlenstoffdioxid auf verschiedene Klassen von Makromolekülen beeinflussen. Durch die Veränderung metabolischer Raten kann auch die Wachstumsrate beeinflusst werden. Allgemein gilt für Mikroorganismen, dass zunächst mit steigender Temperatur die Wachstumsrate zunimmt, bis die höchste Wachstumsrate bei einer optimalen Temperatur erreicht wird. Bei dieser Temperatur weist die Algenzelle die geringste Größe sowie die niedrigsten Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte auf (Goldman & Mann, 1980; Hu, 2013). Bei Überschreitung der optimalen Temperatur findet meist ein schnelles und starkes Absinken der Wachstumsrate statt (Weuster-Botz & Takors, 2018). Eine stark temperaturabhängige Reaktion bei Mikroalgen ist die Elektronenabgabe einer Untereinheit des P680-Dimers im Photosystem II (Reinman & Mathis, 1981). Da photoautotrophe Organismen auf den Ablauf der Photosynthese und den damit verbundenen Aufbau von Energieäquivalenten sowie Makromolekülen angewiesen sind, beeinflusst der Elektronentransport den gesamten Metabolismus. Unter anderem wird bei Steigerung der Temperatur der Anteil des verschwenderischen Vorgangs der Photorespiration an der Rubisco erhöht. Das liegt an einer stärkeren Steigerung der Halbsättigungskonstante von CO<sub>2</sub> verglichen mit O<sub>2</sub> bei steigender Temperatur (Berry & Raison, 1981). Zusätzlich sinkt bei steigender Temperatur das Verhältnis von gelöstem CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub>, was ebenfalls zu einer verstärkt stattfindenden Photorespiration führt (Raven & Geider, 1988).

Ein wichtiger Adaptionsmechanismus von Mikroalgen an Temperaturschwankungen ist die Anpassung der Membranzusammensetzung, um die Stabilität der Zelle sowie die Durchlässigkeit verschiedener Substrate zu gewährleisten. Unterhalb der optimalen Temperatur sinkt der Gesamtgehalt an Lipiden, dafür steigt der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Membranen. Die dadurch erhöhte Stabilität und Fluidität der Thylakoidmembranen schützt das Photosystem II vor Photoinhibition, die bei niedrigen Temperaturen auftreten kann (Hu, 2013; Nishida & Murata, 1996). Liegen Temperaturen unter dem Optimum vor, werden zudem einige Enzyme vermehrt gebildet, um die Aktivität bei photosynthetischen und respiratorischen Prozessen zu erhalten (Hu, 2013). Bei Versuchen mit *Chlorococcum* sp. konnte außerdem bei einer Temperatursteigerung von 20°C auf 35°C beinahe eine Verdopplung des Gesamtgehalts an Carotinoiden beobachtet werden (Liu & Lee, 2000). Dieser Mechanismus ist aufgrund von steigender Bildung von Sauerstoffradikalen bei erhöhter Temperatur notwendig. Durch Oxidation der Carotinoide werden diese fixiert und die Photosysteme werden vor Inaktivierung geschützt (Boucher *et al.*, 1977). Auch das Verhältnis verschiedener Carotin-Spezies, wie

$\alpha$ -Carotin zu  $\beta$ -Carotin, bzw. 9-*cis*- $\beta$ -Carotin zu all-*trans*- $\beta$ -Carotin, wird von der Temperatur beeinflusst (Gómez & González, 2005; Orset & Young, 1999).

Die Temperatur kann zusätzlich direkt Einfluss auf die Photosyntheserate nehmen. Bei Hitzestress wird der Sauerstoff-erzeugende Komplex inaktiviert, da Mangan aus dem Zentrum verloren geht (Murata *et al.*, 2007; Nash *et al.*, 1985). Bei niedrigen Temperaturen wurde gezeigt, dass die Synthese verschiedener, in der Photosynthese aktiver Proteine gehemmt wird (Allakhverdiev & Murata, 2004). Die Folge ist eine scheinbare Erhöhung der Photoinhibition, da die Photosyntheserate bereits bei niedrigeren Eingangsphotonenflussdichten sinkt. Das resultiert allerdings aus einer Reduktion der Reparaturmechanismen bei niedriger Temperatur (Murata *et al.*, 2007).

Das Temperaturoptimum der meisten Mikroalgen liegt zwischen 22 °C und 35 °C (Singh & Singh, 2015). Auch wenn ein Algenstamm unter konstanten Laborbedingungen bei hohen Temperaturen kein Wachstum mehr aufweist, bedeutet das nicht zwingend, dass noch höhere Temperaturen im Freiland nicht kurzfristig toleriert werden können (Soeder, 1971). Trotzdem sollte die Temperatur größtenteils im oder nahe am Optimum liegen, um eine hohe Produktivität zu gewährleisten.

### Salinität

Je nach Habitat bevorzugen Mikroalgen unterschiedliche Salzgehalte. Süßwasseralgen besitzen ihr Optimum bei 0 g L<sup>-1</sup> NaCl (Borowitzka, 2005), während marine Mikroalgen am besten bei leicht unterhalb ihres ursprünglichen Habitats liegenden Salinitäten zwischen 20-24 g L<sup>-1</sup> NaCl wachsen (Gualtieri & Barsanti, 2006). Zusätzlich gibt es halotolerante Mikroalgen, die sehr hohe Salzgehalte überleben können. Bei dem wohl bekanntesten Vertreter handelt es sich mit *Dunaliella salina* um einen Stamm, der Salzgehalte bis 350 g L<sup>-1</sup> NaCl tolerieren kann (Borowitzka, 2005).

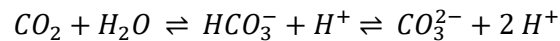
Durch Abbau oder Einlagerung von kleinen Molekülen oder osmoregulatorischen Substanzen – den Osmolyten – sind Mikroalgen in der Lage, sich schnell an veränderte Salzgehalte anzupassen. Zumeist handelt es sich bei diesen Substanzen um Glycerin, Mannitol, Galactitol, Sorbitol oder weitere Polyole. Darüber hinaus zeigt der Salzgehalt der Umgebung stammabhängig Einflüsse auf den Lipid- sowie Carotinoidstoffwechsel (Hu, 2013). Bei *D. salina* konnten bei sprunghaftem Anstieg der Salinität starke Steigerungen der Carotinoidproduktion beobachtet werden, wobei auch der Anteil an  $\beta$ -Carotin am Gesamtcarotinoidgehalt erhöht wurde (Borowitzka *et al.*, 1990). Durch Salzstress wird zudem der Mechanismus zur Reparatur lichtgeschädigter PS II-Komplexe gehemmt. NaCl stört dabei die *de novo*-Synthese nahezu aller Proteine, unter anderem auch des D1-Protein des Photosystems (Allakhverdiev *et al.*, 2002; Allakhverdiev & Murata, 2004; Murata *et al.*, 2007).

Gerade für Kultivierungen in offenen Reaktorsystemen ist die Toleranz gegenüber Salzschwankungen essentiell. Niederschläge führen zu einer Verdünnung der Medienkomponenten, Verdunstungen zu

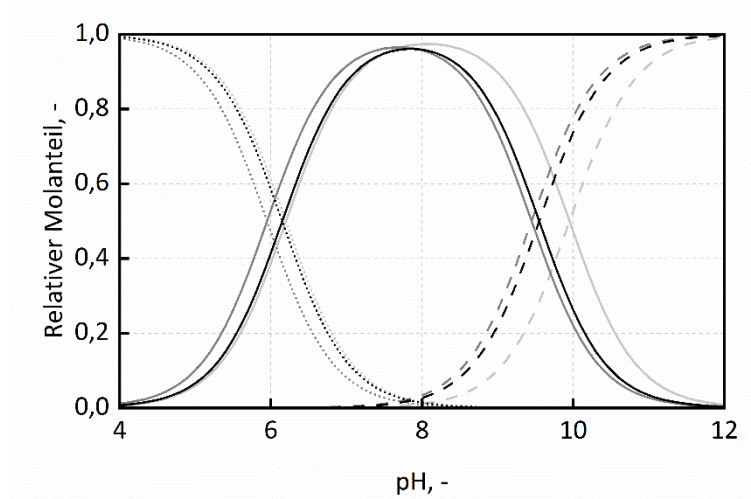
einer Konzentrierung. Gerade bei halotoleranten Mikroalgenstämmen ist eine erhöhte Salinität wünschenswert, um weniger Salz-tolerante Kontaminanten zu vermeiden (Borowitzka, 2005).

### Anorganisches Kohlenstoffdioxid und pH

Für den photoautotrophen Aufbau von Speicherstoffen in der Zelle ist  $\text{CO}_2$  als Kohlenstoffquelle unabdingbar. Dieses liegt im Wasser gelöst in folgendem Gleichgewicht als Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ), Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) sowie Carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) vor.



Das Gleichgewicht mit den resultierenden Verteilungen der Kohlenstoffspezies ist stark vom pH sowie der Salinität des Mediums abhängig und in Abbildung 3.9 zusammengefasst.



**Abbildung 3.9:** Darstellung des Bicarbonat-Puffersystems. Dargestellt ist der relative Molanteil der Kohlenstoffspezies Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ , gepunktete Linie), Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ , durchgezogene Linie) und Carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ , gestrichelte Linie) bei  $0 \text{ g L}^{-1}$  NaCl (—),  $60 \text{ g L}^{-1}$  NaCl (—) und  $280 \text{ g L}^{-1}$  NaCl (—) und einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Berechnung erfolgte über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit Dissoziationskonstanten nach Millero *et al.* (2007) (vgl. Abschnitt A.1).

Unter pH 4 liegt unabhängig vom Salzgehalt im Wasser fast ausschließlich  $\text{CO}_2$  vor. Bei etwa pH 8,0 wird das Maximum an Hydrogencarbonat in Lösung erreicht. Bei einem pH  $> 12$  ist nur noch Carbonat verfügbar. Die Salinität beeinflusst die Gleichgewichtskonstanten der Dissoziationsreaktionen und somit den Anteil an vorliegenden Kohlenstoffspezies leicht. Besonders das Gleichgewicht beim Übergang von Hydrogencarbonat zu Carbonat, bei dem beide Spezies zu gleichen Teilen vorliegen, wird bei Steigerung der Salinität von  $0$  auf  $60 \text{ g L}^{-1}$  NaCl von pH 10 zu pH 9,5 verschoben. Bei weiterer Erhöhung der Salinität liegt eine Steigerung des pKs-Wertes vor (Millero *et al.*, 2007), womit die Verteilungen wieder leicht verschoben werden. Einen weiteren Einflussfaktor auf die Gleichgewichtskonstanten des Bicarbonat-Puffersystems stellt die Temperatur dar. Bei niedriger Temperatur liegt eine höhere Löslichkeit von Gasen in Wasser vor.

Die Art der vorliegenden Kohlenstoffspezies ist entscheidend für das Wachstum. Alle Algen sind in der Lage diffusiv  $\text{CO}_2$  aufzunehmen, zur Aufnahme von  $\text{HCO}_3^-$  hingegen werden aktive Aufnahmesysteme benötigt, die viele Algen besitzen.  $\text{CO}_3^{2-}$  kann nicht von Algen aufgenommen werden. Algen, die bei hochsalinen Bedingungen wachsen, sind also verglichen mit marinen Mikroalgen vermehrt Kohlenstofflimitierungen ausgesetzt. (Borowitzka, 2007)

Um solche Limitierungen und einen Anstieg des pH durch eine Akkumulation von  $\text{OH}^-$ -Ionen zu vermeiden, ist eine Zugabe von  $\text{CO}_2$  sinnvoll. Eine verbreitete Methode ist dabei die automatische pH-Regelung durch Zudosierung von  $\text{CO}_2$  (Grobelaar, 2013). Das dabei zu berücksichtigende pH-Optimum der meisten Mikroalgen liegt im leicht basischen Bereich (Gualtieri & Barsanti, 2006). In einem bestimmten Toleranzbereich des pH wird der interne pH der Zelle konstant gehalten. Wird dieser Bereich unter- oder überschritten, kommt es ebenfalls zu starken Veränderungen des zellinternen pH. Bei zu starkem Abweichen des internen pH vom Optimum können Enzyme nur mit deutlich verringerter Aktivität oder schließlich gar nicht mehr arbeiten. Dieser Bereich liegt bei Mikroalgen etwa zwischen pH 7 und pH 9. (Coleman & Colman, 1981; Gehl & Colman, 1985)

Bei verschiedenen Spezies kann eine pH-Erhöhung zu einer Steigerung des Gesamtlipidgehalts sowie des Gehalts an Triacylglycerolen führen (Gardner *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

### **Sauerstoff**

Durch die Herstellung von Sauerstoff während der Photosynthese kann es in dichten Mikroalgenkulturen zu dessen Akkumulation kommen (Borowitzka, 2007). Der Überschuss an Sauerstoff begünstigt die Photorespiration, wodurch eine Reduktion der Photosynthese beobachtet werden kann (Moheimani & Borowitzka, 2007). Zusätzlich führt eine Anreicherung des reaktiven Singulett-Sauerstoffs im Zellinneren zu einer Hemmung der Herstellung der D1-Untereinheit des Photosystems II und einer damit verbundenen Erhöhung der Photoinhibition (Nishiyama *et al.*, 2004).

### **Nährstoffe**

Neben Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle benötigt die Algenzelle vor allem Stickstoff und Phosphor zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels. Mikroalgentrockenmasse besteht dabei zu über 99 % aus Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor. Weitere Elemente wie Calcium, Kalium, Natrium, Chlor, Magnesium, Eisen und Silicium sowie weitere Spurenelemente werden nur in geringen Mengen benötigt (Grobelaar, 2013; Gualtieri & Barsanti, 2006).

**Stickstoff** wird im Stoffwechsel zum Aufbau von Enzymen, Chlorophyllen, ATP/ADP und RNA/DNA genutzt und macht in Mikroalgenbiotrockenmasse einen Anteil zwischen 7-10 % aus (Gualtieri & Barsanti, 2006; Hu, 2013). Nur wenige Mikroorganismen sind in der Lage, atmosphärischen Stickstoff

zu reduzieren. Daher muss bei der Kultivierung der meisten Mikroalgen Stickstoff in Form von Nitrat, Ammonium(hydroxid) oder Harnstoff zugegeben werden (Grobbelaar, 2013; Hu, 2013). Stickstoff kann von Mikroalgen schlecht gespeichert werden, sodass sich ein Mangel direkt auf den Stoffwechsel auswirkt (Hu, 2013). Durch Stickstoffmangel kann beispielsweise der Stoffwechsel von der Proteinsynthese hin zur Produktion von neutralen Lipiden wie Triacylglycerolen verschoben werden (Hu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Thompson, 1996). Einen weiteren Adaptionsmechanismus an Stickstoffmangel stellt die Einlagerung von Kohlenhydraten durch *D. salina* dar (Ben-Amotz *et al.*, 1985). Darüber hinaus wurde eine Erhöhung von Gesamt-Carotinoid-Gehalt sowie  $\beta$ -Carotin-Gehalt bei niedrigen Stickstoffkonzentrationen mit einhergehendem Abbau von Chlorophyll beschrieben (Hu, 2013; Lamers *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 2011).

**Phosphor** ist für Wachstum, Energietransfer in der Zelle sowie die Synthese von Membranen, Nukleinsäuren, DNA, RNA und ATP unabdingbar (Grobbelaar, 2013; Gualtieri & Barsanti, 2006). Der Anteil von Phosphor an Algenbiomasse beträgt unter 1%. Dieser wird meist in Form von Orthophosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) von Algen aus dem Wasser aufgenommen und kann in Polyphosphat-Einschlusskörpern gespeichert werden. (Grobbelaar, 2013)

**Schwefel** macht einen Anteil von 0,15-2 % an der Biotrockenmasse von Algen aus und liegt in einem ähnlichen Atomverhältnis wie Phosphor vor. Die Aufnahme erfolgt über aktiven Transport von Sulfaten. In der Zelle wird Sulfat reduziert und in Schwefel-enthaltende Aminosäuren und weitere organische Stoffe eingebaut (Gualtieri & Barsanti, 2006; Liu & Chen, 2016). Ein Mangel an Schwefel führt zur Wachstumsverringering, jedoch kann die  $\beta$ -Carotin-Produktion gesteigert werden (Shaker *et al.*, 2017).

**Eisen** ist normalerweise in offenen Gewässern für Algenwachstum der limitierende Nährstoff. Vor allem in der Elektronentransportkette spielt Eisen durch seine Redox-Eigenschaften in Eisen-Schwefel-Clustern und anderen photosynthetischen Proteinen eine wichtige Rolle (Godman & Balk, 2008). Dabei trägt Eisen entscheidend zur Photosynthese, Respiration, Stickstofffixierung und DNA-Synthese bei (Hu, 2013). Zumeist wird von Algen im Chelat-Komplex vorliegendes Eisen bevorzugt, da die oxidierte Form schlecht aufgenommen werden kann (Hannon *et al.*, 2010). Eisenmangel kann bei Mikroalgen zu einem Abbau eisenhaltiger Proteine führen, wohingegen die Bildung von Elektronentransportern ohne Eisen angeregt werden kann (Bottin & Lagoutte, 1992; McKay *et al.*, 1999). Zusätzlich führt diese Limitierung bei *D. salina* zu einer Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts (Shaker *et al.*, 2017).

Neben den bereits genannten und in den größten Mengen notwendigen Nährstoffen werden zusätzlich für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels kleine Mengen verschiedener weiterer Elemente (Calcium, Kalium, Chlor, Magnesium), Spurenelemente, aber teilweise auch Vitamine benötigt (Grobbelaar, 2013). Eine interessante Möglichkeit Nährstoffe nachhaltig und kostengünstig

zuzusetzen, ist die Nutzung von nährstoffreichem Abwasser oder Oberflächenablauf von landwirtschaftlich genutzten Flächen (Hannon *et al.*, 2010).

### **Reaktorschichtdicke und Zelldichte**

Sowohl Schichtdicke als auch Zelldichte beeinflussen die Lichtverfügbarkeit in der Zellsuspension sehr stark. Es konnte gezeigt werden, dass die optimale photosynthetische Produktivität von der Zelldichte abhängt und somit eine optimale Zelldichte, bei der die photosynthetische Produktivität maximal ist, für jede Lichtquelle existiert (Myers & Graham, 1959). Geringere Zelldichten können zu einer Reduktion der Produktivität durch Lichtinhibierung führen, bei höheren Zelldichten beschatten sich die Zellen gegenseitig, sodass einige Zellen kaum Licht erreicht und die Lichtreaktion der Photosynthese nicht stattfinden kann. Direkt abhängig von der Zelldichte ist also die Lichteindringtiefe in die Zellsuspension (Richmond, 2013). Liegt bei gleicher Zelldichte eine größere Schichtdicke vor, werden prozentual mehr Zellen beschattet, weshalb die Lichtverfügbarkeit in der Suspension weiter sinkt. Um negative Effekte bei hohen Zelldichten zu verhindern, kann der Lichtlimitierung durch Reduktion der Schichtdicke entgegengewirkt werden (Soeder, 1971).

### **Durchmischung**

Um eine Ausbildung von Nährstoff- oder pH-Gradienten oder das Ablagern von Algenzellen zu vermeiden, den Stoffübergang zwischen Luft und Medium zu steigern und eine vergleichbare Lichtverfügbarkeit pro Zelle zu gewährleisten, ist die Durchmischung der Mikroalgensuspension von großer Bedeutung (Grobbelaar, 2010; Gualtieri & Barsanti, 2006). Das Mischen wird abhängig vom verwendeten Bioreaktor durch Schütteln (Erlenmeyerkolben), Begasung (Blasensäulen), Umwälzen mit einem Schaufelrad (*Raceway Ponds*) oder Pumpen (Rohrreaktoren) durchgeführt. Es treten je nach Zelldichte, Absorptionseigenschaften und Reaktorgeometrie Zonen mit hoher und niedriger Lichtverfügbarkeit im Photobioreaktor auf. Durch Wechseln der Zellen zwischen den verschiedenen Zonen können Licht-Dunkel-Frequenzen erreicht werden, die dem *flashing light effect* entsprechen und somit eine Erhöhung der Photosyntheserate nach sich ziehen (vgl. Unterpunkt Lichtverfügbarkeit). Neben den genannten positiven Effekten einer guten Durchmischung kann durch hydrodynamischen Stress aufgrund des Energieeintrags stammabhängig eine Beschädigung der Zellen auftreten. Um eine Reduktion der Wachstumsraten durch zu starke Durchmischung zu verhindern, ist also ein Kompromiss dieser entgegengesetzten Auswirkungen notwendig (Grobbelaar, 2010).

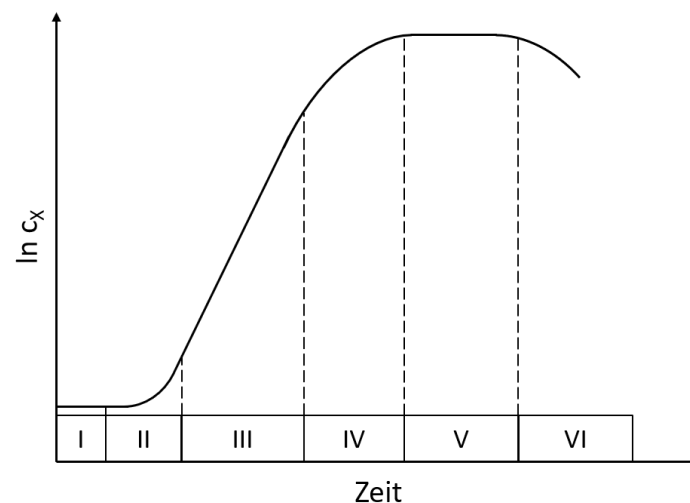
## 3.3 Modellierung des phototrophen Wachstums

Die Lichtabhängigkeit des Wachstums von Mikroalgen kann mit verschiedenen Modellen bei konstanter Eingangsphotonenflussdichte beschrieben werden (Koller *et al.*, 2017; Koller, 2017;

Pfaffinger *et al.*, 2016; Pfaffinger, 2017). Eine wichtige Prozessgröße ist dabei die mittlere integrale Photonenflussdichte, deren Berechnung für Tag-Nacht-Verläufe im Folgenden beschrieben wird. Des Weiteren wird auf das Wachstum von Mikroalgen im Satzprozess eingegangen. Modellgestützte Untersuchungen können helfen, das Wachstum von Mikroalgen unter verschiedenen Bedingungen besser zu verstehen und abzuschätzen.

### 3.3.1 Phototrophes Wachstum im Satzprozess

Ein Satzprozess beschreibt eine Kultivierung mit konstant bleibendem Volumen, bei der alle Substrate und Nährstoffe zu Beginn vorgelegt werden. Während des laufenden Prozesses findet neben Gaszufuhr, geringen Strömen von Säure oder Base zur pH-Regelung oder Zugabe von Antischaummittel keine Zufuhr von Stoffströmen statt (Takors & Weuster-Botz, 2018). Das Wachstum von Mikroorganismen lässt sich im Satzprozess in einem ideal homogen durchmischten Reaktor in sechs Phasen unterteilen und ist in Abbildung 3.10 dargestellt.



**Abbildung 3.10:** Schematische Darstellung einer idealisierten Wachstumskurve von Mikroorganismen im Satzverfahren. I: Adaptionphase; II: 1. Übergangsphase; III: Exponentielles Wachstum; IV: 2. Übergangsphase; V: Stationäre Phase; VI: Absterbephase.

Während der Adaptionphase (I) findet kein Wachstum statt, da eine Anpassung der Zellen an die neuen Bedingungen stattfindet. Je nach Stamm und Zustand der Vorkultur kann diese Anlaufphase unterschiedlich lange dauern. Die daran anschließende erste Übergangsphase (II) beschreibt das langsam steigende Wachstum. Ist das maximale Wachstum mit der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  erreicht, wird von exponentiellem Wachstum gesprochen (III). Flacht die Wachstumskurve beispielsweise durch Akkumulation inhibierender Stoffwechselprodukte oder dem Verbrauch von Medienkomponenten ab, wird die zweite Übergangsphase (IV) erreicht. Bei phototrophen Mikroorganismen kommt es häufig zu einer längeren Übergangsphase mit linearem Wachstum, wenn Licht bei höheren Zelldichten limitierend wirkt (Lee *et al.*, 2013). Im Anschluss liegen Zellwachstum und

Absterberate in der stationären Phase (V) im Gleichgewicht vor. Abschließend überwiegt die Absterberate und die Absterbephase (VI) wird erreicht. (Weuster-Botz & Takors, 2018)

Die spezifische Wachstumsrate der Zellen ist nach Gleichung 3.3 definiert.

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \frac{dc_x}{dt} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

- $\mu$ : spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_x$ : Konzentration der Biotrockenmasse,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $t$ : Zeit, h

Durch Integration ergibt sich aus Gleichung 3.3 folgender exponentieller Zusammenhang bei konstanter Wachstumsrate.

$$c_X = c_{X,0} \cdot e^{\mu_{\text{konst}} \cdot \Delta t} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

- $c_X$ : Konzentration der Biotrockenmasse,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $c_{X,0}$ : Anfangskonzentration der Biotrockenmasse,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $\mu_{\text{konst}}$ : spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $\Delta t$ : Zeit, h

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  wird üblicherweise empirisch mit einer Sättigungskinetik beschrieben, die in Gleichung 3.5 zusammengefasst ist. Durch vereinfachte Annahmen – es besteht nur die Abhängigkeit von einer limitierenden Substratkonzentration  $c_S$  – kann zusätzlich zur exponentiellen Wachstumsphase auch die zweite Übergangsphase damit beschrieben werden.

$$\mu = \mu_{\text{max}} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

- $\mu$ : spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $\mu_{\text{max}}$ : maximale spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$   
 $c_S$ : Substratkonzentration,  $\text{g L}^{-1}$   
 $K_S$ : Sättigungskonstante des Substrates,  $\text{g L}^{-1}$

Bei der Sättigungskonzentration  $K_S$  liegt die halbmaximale Wachstumsrate vor. Die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$  kann nur bei sehr hoher Substratkonzentration erreicht werden. Inhibiert das Substrat bei sehr hohen Konzentrationen jedoch das Wachstum, muss der kinetische Ansatz erweitert werden. Bei Mikroalgen lässt sich als Beispiel vor allem der Effekt der Lichtinhibition nennen. Beispiele für formalkinetische Wachstumskinetiken mit Berücksichtigung einer Substratinhibition nach Andrews



(1968), Pfaffinger *et al.* (2016), Webb (1963), Yano & Koga (1969), Schröder *et al.* (1997) Aiba *et al.* (1968) und Edwards (1970) sind in Gleichung 3.6-3.11 zusammengefasst.

$$\text{Andrews} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

$$\text{Pfaffinger} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + c_S \left(\frac{c_S}{K_I}\right)^\varphi} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

$$\text{Yano-Koga ,F'} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_{I,1}} + \frac{c_S^3}{K_{I,2}^2}} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

$$\text{Yano-Koga ,R'} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^3}{K_I^2}} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

$$\text{Webb} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S \cdot \left(1 + \frac{\beta \cdot c_S}{K_I}\right)}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_I}} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

$$\text{Aiba-Edwards} \quad \mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot e^{\left(\frac{-c_S}{K_I}\right)} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

$\mu$ : spezifische Wachstumsrate,  $h^{-1}$

$\mu_{max}$ : maximale spezifische Wachstumsrate,  $h^{-1}$

$\varphi$ : Sensitivitätsfaktor, -

$c_S$ : Substratkonzentration,  $g L^{-1}$

$K_S$ : Sättigungskonstante des Substrates,  $g L^{-1}$

$K_I$ : Inhibierungskonstante des Substrates,  $g L^{-1}$

$\beta$ : empirische Konstante, -

Auch für diese Modelle gelten die Annahmen, die für den formalkinetischen Ansatz einer Sättigungskinetik vorausgesetzt werden.

Wird für den Erhaltungsstoffwechsel ebenfalls das limitierende Substrat benötigt, muss eine Erweiterung vorgenommen werden. Für die Inhibitionskinetik nach Andrews ist dies beispielhaft in Gleichung 3.12 gezeigt.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S + \frac{c_S^2}{K_I}} - m_S \cdot Y_{XS,\mu} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

$\mu$ : spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

$\mu_{max}$ : maximale spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

$c_S$ : Substratkonzentration,  $\text{g L}^{-1}$

$K_S$ : Sättigungskonstante des Substrates,  $\text{g L}^{-1}$

$m_S$ : spezifische Substrataufnahme für den Erhaltungstoffwechsel,  $\text{g g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}$

$Y_{XS,\mu}$ : Ertragskoeffizient,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{g}^{-1}$

Bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen nimmt die Wachstumsrate aufgrund von absterbenden Zellen somit einen negativen Wert an, da die Substratkonzentration nicht mehr für den Erhaltungstoffwechsel ausreicht. (Weuster-Botz & Takors, 2018)

Zur wirtschaftlichen Beurteilung kann die Raum-Zeit-Ausbeute zu Rate gezogen werden. Diese beschreibt die Biomasse- oder Produktbildung, die pro Volumen- und Zeiteinheit gebildet wird, und kann in Satzprozessen nach Gleichung 3.13 bestimmt werden.

$$RZA = \frac{\Delta m_i}{V \cdot \Delta t} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

$\Delta m_i$ : Gebildete Biomasse-/Produktkonzentration, g

$V$ : Reaktorvolumen, L

$\Delta t$ : Reaktionszeit, d

Findet eine Produktextraktion direkt aus der Zellsuspension statt, ist eine hohe Konzentration des Zielproduktes in der Zellsuspension erstrebenswert. Liegt ein intrazelluläres Produkt vor, das nach einer Konzentrierung der Biomasse extrahiert werden soll, ist der Gehalt des Produkts in der Biomasse interessant.

### 3.3.2 Lichtabschwächung in Photobioreaktoren

Mikroalgen können Licht aufgrund ihrer Pigmentzusammensetzung vor allem im photosynthetisch aktiven Bereich der Strahlung (PAR, *photosynthetic active radiation*) nutzen. Der damit gemeinte Bereich zwischen den Wellenlängen 400-750 nm entspricht dabei nahezu dem für das menschliche Auge sichtbaren Licht (Carvalho *et al.*, 2011). Licht wird durch seine Frequenz  $f$  und Wellenlänge  $\lambda$  als elektromagnetische Welle beschrieben.

$$f \cdot \lambda = c_L \quad \text{Gleichung 3.14}$$

- $f$ : Frequenz,  $s^{-1}$   
 $\lambda$ : Wellenlänge, m  
 $c_L$ : Lichtgeschwindigkeit,  $2,997 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$

Die kleinstmögliche Energiemenge der elektromagnetischen Strahlung einer bestimmten Frequenz wird als Photon bezeichnet. Die Energie eines Photons  $E$  wird durch das Produkt aus Frequenz  $f$  und Planck'schem Wirkungsquantum  $h$  beschrieben.

$$E = h \cdot f = h \cdot \frac{c_L}{\lambda} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

- $f$ : Frequenz,  $s^{-1}$   
 $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum ( $6,626 \cdot 10^{-34}$ ), J s  
 $\lambda$ : Wellenlänge, m  
 $c_L$ : Lichtgeschwindigkeit ( $2,997 \cdot 10^8$ ),  $\text{m s}^{-1}$

Als Eingangspotonenflussdichte wird die Lichtmenge an Photonen ( $\mu\text{mol}$ ) bezeichnet, die pro Fläche ( $\text{m}^2$ ) und Zeiteinheit (s) auf die Oberfläche der Algenkultur auftrifft. Erfolgt die Messung der Lichtenergie in  $\text{W m}^{-2}$ , ist eine Umrechnung in die Photonenflussdichte über den im Mittel gültigen Faktor  $4,7 \mu\text{mol W}^{-1} \text{ s}^{-1}$  möglich (Pfaffinger, 2017).

Die auftreffende Photonenflussdichte wird beim Durchgang durch die Mikroalgensuspension abhängig von der Eindringtiefe sowie der Zellkonzentration abgeschwächt. Dabei spielen verschiedene physikalische Effekte eine wichtige Rolle. Zum einen werden Photonen zur Energiegewinnung von Lichtsammelkomplexen im Photosyntheseapparat absorbiert. Des Weiteren kann es an Zellen zur Lichtstreuung kommen.

Liegt in der Suspension eine homogene Durchmischung der Algensuspension vor und kann die Lichtstreuung an der Oberfläche der Algensuspension sowie den Zellen vernachlässigt werden, kann die Lichtabschwächung durch verschiedene Modelle angenähert werden. Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz in Gleichung 3.16 beschreibt die exponentielle Abnahme von Licht in Abhängigkeit der Zellkonzentration  $c_x$  sowie der Schichtdicke  $l$  mit dem eingeführten Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$ . Da eine Gültigkeit dieses Gesetzes nur in verdünnten Lösungen vorliegt (Schmidt, 2000), kann eine Modifikation des Absorptionsterms nach Gleichung 3.17 vorgenommen werden (Havel, 2006). Ein weiteres Gesetz zur Lichtabschwächung wurde 1993 von Reynolds & Pacala etabliert und ist in Gleichung 3.18 zusammengefasst.

**Bouguer-Lambert-Beer**  $I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c_x \cdot l}$  **Gleichung 3.16**

**Modifikation nach Havel**  $I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot \sqrt{c_x} \cdot l}$  **Gleichung 3.17**

**Reynolds-Pacala**  $I = \frac{I_0}{1 + \varepsilon \cdot c_x \cdot l}$  **Gleichung 3.18**

$I$ : Photonenflussdichte nach Austritt aus dem Medium,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$I_0$ : Photonenflussdichte bei Auftreffen auf das Medium,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1} / \text{L}^{0,5} \text{g}^{-0,5} \text{cm}^{-1}$

$c_x$ : Biotrockenmassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

$l$ : Schichtdicke, cm

Durch die Lichtabschwächung kommt es im Reaktor zur örtlichen Ausbildung verschiedener Lichtzonen, durch die das Wachstum beeinflusst wird (Pruvost & Cornet, 2012). Ortsabhängig befinden sich die Algen in lichtlimitierten, lichtgesättigten oder lichtinhibierten Zonen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Wo Licht direkt auf die Oberfläche der Algensuspension trifft, können die Zellen durch die hohe Lichtverfügbarkeit inhibiert werden. Abhängig von der vorliegenden Zelldichte geht diese Zone bei einer bestimmten Entfernung zur Lichtquelle in eine lichtgesättigte Zone über. Bei weiter steigender Schichtdicke und der resultierenden Absorption von Licht durch die Zellen nimmt die Lichtverfügbarkeit weiter ab und es entsteht eine lichtlimitierte Zone. Findet aufgrund der Durchmischung der Algensuspension ein schneller Wechsel der Algen in Lichteinstrahlrichtung im Reaktor statt, können durch den schnellen Wechsel zwischen lichtinhibierter und -limitierter Zone auch bei konstanter Bestrahlung *flashing light effects* auftreten.

### 3.4 Extraktion von $\beta$ -Carotin aus Mikroalgen

Bei intrazellulär vorliegenden Produkten wie  $\beta$ -Carotin erfolgt die Produktaufarbeitung in der Reihenfolge Zellabtrennung, Zellaufschluss, Produktgewinnung und -konzentrierung sowie Produktreinigung (Chmiel, 2018). Da es sich bei  $\beta$ -Carotin um ein sehr schlecht wasserlösliches Molekül handelt, werden zusätzlich Anforderungen an Lösemittel sowie die Flüssig-Flüssig-Extraktion betrachtet. Im industriellen Maßstab werden Lösemittelextraktionen aus Zellsuspension mit Stoffaustauschapparaten wie auch einem Zentrifugalextraktor durchgeführt. Daher wird ebenfalls ein Überblick über die Zentrifugalextraktion gegeben.

### 3.4.1 Zellaufschluss

Findet die Bildung des gewünschten Produkts wie bei  $\beta$ -Carotin intrazellulär statt, ist der Zellaufschluss zur Freisetzung von großer Bedeutung. Es kann sich hier um mechanische, physikochemische oder biologische Verfahren handeln. Zu den mechanischen Aufschlussverfahren zählen unter anderem Schwingmühle, Kugelmühle, Ultraschall, Homogenisatoren und hydrodynamische Kavitation. Aufschluss durch osmotischen Druck, Gefrieren und Auftauen, Gefriertrocknung oder die Zugabe von Lösemittel, Säure, Base oder Detergentien werden den physikochemischen Verfahren zugeordnet. Bei biologischen Verfahren werden den Zellen Viren, Phagen, Antibiotika oder lytische Enzyme zugesetzt, die dann einen Aufschluss der Zelle nach sich ziehen. (Chmiel, 2018)

In **Schwingmühlen** erfolgt der Aufschluss mechanisch über Scherkräfte, die bei der Beschleunigung von Glasperlen beim Mischen entstehen. Dieses Verfahren ist sehr gut für kleine Volumina geeignet und durch die kurze benötigte Zeit im Labormaßstab sehr beliebt. (Hummel & Kula, 1989; Schütte & Kula, 1988)

In **Hochdruckhomogenisatoren** findet der Zellaufschluss mechanisch durch hydrodynamische Kräfte statt. Durch hohen Druck mit anschließender Druckentspannung am Homogenisierventil und damit verbundenen hohen Strömungsgeschwindigkeiten kommt es sowohl zu Scher-, Dehn- und Normalkräften als auch zu Turbulenz und Kavitation, die auf die Zellen wirken. Neben der Gestaltung des Ventils spielt auch die angelegte Druckdifferenz eine wichtige Rolle. Aus wirtschaftlichen Gründen ist eine Nutzung von hohen Biomassekonzentrationen zu bevorzugen, da in gleicher Zeit deutlich mehr Biomasse aufgeschlossen werden kann. (Chmiel, 2018)

Der **Zellaufschluss mit Lösemitteln** ist die Folge von erhöhter Zellpermeabilität. Durch eingesetzte Lösemittel wird die Struktur der Zellwand verändert und bei vielen Lösemitteln verliert die Zelle ihre Viabilität. (Felix, 1982; Flores *et al.*, 1994)

### 3.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen werden zwei begrenzt miteinander mischbare Phasen zusammengeführt, wobei der Extraktstoff vom Trägerstoff in das Lösemittel wechselt. Letzteres wird im Anschluss zum Extrakt, da es den Extraktstoff enthält. Der vormalige Trägerstoff wird im Anschluss als Raffinat bezeichnet (Behr *et al.*, 2016). Im Laborbetrieb findet meist eine diskontinuierliche Extraktion statt, bei der beide Phasen bis zur Einstellung des Lösungsgleichgewichts gemischt werden. Im Anschluss kann die Trennung und Separation der Phasen stattfinden. Im industriellen Maßstab sind in der chemischen Industrie kontinuierliche Verfahren wie Mischer-Scheider-Einheit, Extraktionskolonnen und Zentrifugalextraktoren zur Lösemittelextraktion üblich. (Behr *et al.*, 2016; Schügerl, 1994)

Dieses Trennverfahren kommt zum Einsatz, wenn temperaturempfindliche Komponenten beteiligt sind, der Zielstoff nur in geringer Menge vorliegt oder eine Rektifikation zu aufwendig wäre. Industriell wird die Solventextraktion vor allem in der Petrochemie, der Hydrometallurgietechnik, aber auch in der Abwasserreinigung sowie Biotechnologie genutzt. (Schönbucher, 2002)

Liegen konstante Bedingungen wie pH, Temperatur und Druck vor, gilt bei niedrigen Konzentrationen des Extraktstoffes für dessen Verteilung in Trägerstoff und Lösemittel der Nernst'sche Verteilungssatz.

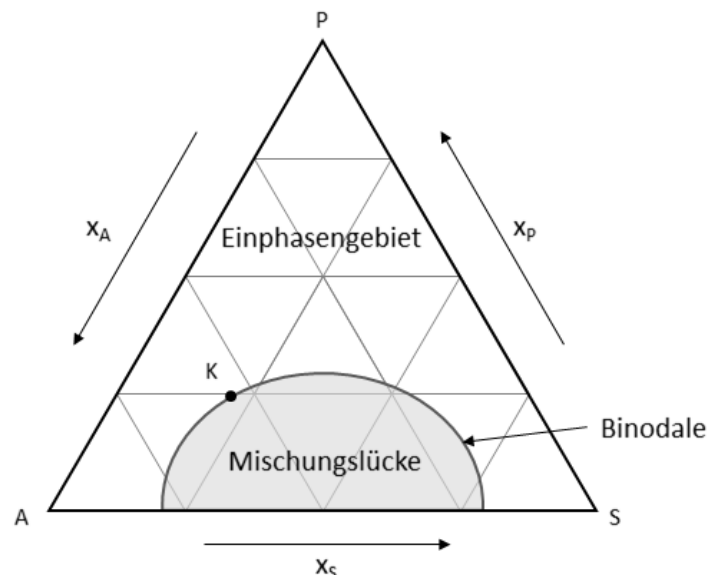
$$K_E = \frac{c_E}{c_R} = \text{const.} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

$K_E$ : Verteilungskoeffizient, -

$c_E$ : Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt, g L<sup>-1</sup>

$c_R$ : Konzentration des Extraktstoffes im Raffinat, g L<sup>-1</sup>

Der Verteilungskoeffizient  $K_E$ , der das Verhältnis von Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt  $c_E$  zur Konzentration im Raffinat  $c_R$  beschreibt, bleibt im Gleichgewicht also konstant. Diese starke Vereinfachung kann in den meisten Fällen nicht angenommen werden, da auch zwischen Lösemittel und Trägerstoff Wechselwirkungen vorliegen können. Hier kann das Löslichkeitsverhalten als Dreiecksdiagramm zwischen den beteiligten Stoffen dargestellt werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.11 gezeigt.



**Abbildung 3.11:** Dreiecksdiagramm zur Darstellung der Phasengleichgewichte eines Dreistoffsystems. Die Binodale trennt das Einphasengebiet, in dem Abgeber A, Solvent S und Produkt P homogen vorliegen, vom Zweiphasengebiet – der Mischungslücke. Der kritische Punkt K unterteilt die Binodale in den Raffinatast und den Extraktast.

Im Dreiecksdiagramm markieren die Eckpunkte die reinen Komponenten. Entlang der Dreiecksseiten sind die jeweiligen Zweistoffgemische dargestellt, innerhalb derer ein Dreistoffgemisch vorliegt. Die Binodale trennt das Einphasengebiet, in dem eine homogene Mischung der drei Komponenten vorliegt, von dem Zweiphasengebiet. In dieser Mischungslücke zerfällt die Mischung an der betreffenden Konode in die Phasen Extrakt und Raffinat und ist somit für die Flüssig-Flüssig-Extraktion unabdingbar. Vom kritischen Punkt wird die Konode in Raffinat- und Extraktast unterteilt. Auf den beiden Ästen lassen sich dann Zusammensetzung von Raffinat- und Extraktphase widerspiegeln. (Behr *et al.*, 2016; Chmiel, 2018)

Bei der Auswahl eines geeigneten Lösemittels spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle. Das Lösemittel sollte zusätzlich zu einer geringen Mischbarkeit mit der Trägerphase eine hohe Selektivität und Kapazität für den Extraktstoff aufweisen. Für eine bessere Phasentrennung sind Dichteunterschiede erforderlich. Auch eine hohe Grenzflächenspannung trägt zur Trennung bei und verhindert die Ausbildung von Emulsionen, allerdings wird der Ausbildung großer Grenzflächen, die durch eine erhöhte Kontaktfläche die Extraktion begünstigt, entgegengewirkt. Niedrige Siedetemperaturen verbessern die Rückgewinnung des Lösemittels, wohingegen ein niedriger Dampfdruck Verdunstungsverluste verringert. In der Handhabung ist zusätzlich eine geringe Toxizität für Umwelt und Menschen von Vorteil. Die Selektivität  $S$  kann mit Gleichung 3.20 bestimmt werden. (Chmiel, 2018)

$$S = \frac{\frac{c_{\text{Extrakt},i}}{c_{\text{Extrakt},j}}}{\frac{c_{\text{Träger},i}}{c_{\text{Träger},j}}} \quad \text{Gleichung 3.20}$$

$c_{\text{Extrakt}}$ : Konzentration im Extrakt,  $\text{mg L}^{-1}$   
 $c_{\text{Träger}}$ : Konzentration im Trägerstoff,  $\text{mg L}^{-1}$   
 $i, j$ : im Trägerstoff vorliegende Komponenten

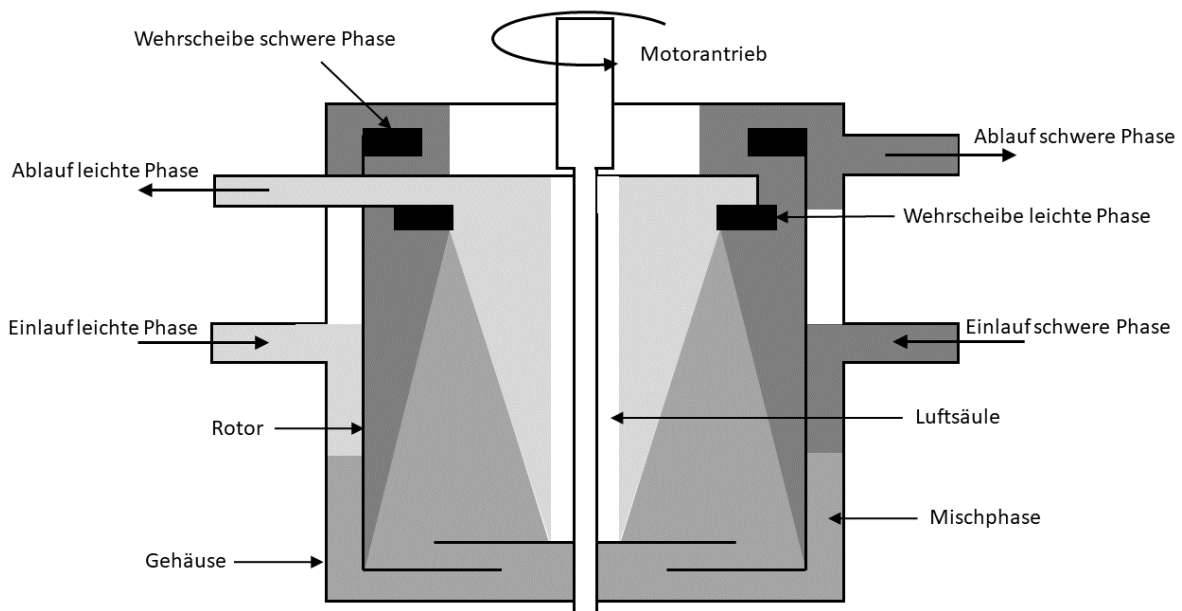
### 3.4.3 Zentrifugalextraktion

Ziel von Extraktionen stellt meist die Optimierung eines Stoffaustausches dar, die durch Stoffaustauschapparate gewährleistet werden kann. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion liegt eine der Phasen zu Tropfen dispergiert in der zusammenhängenden zweiten Phase vor. Generell haben Flüssig-Flüssig-Stoffaustauschapparate eine schnelle Bildung von Tropfen mit engem Größenspektrum zum Ziel. Diese sollten möglichst homogen in der zweiten Phase vorliegen ohne zu koaleszieren. Für den Stoffübergang entscheidend sind zusätzlich eine hohe Austauschfläche, ausreichender Phasenkontakt sowie eine hohe Turbulenz. Zusätzlich sollten die Phasen optimal geführt werden und abschließend gut getrennt werden können. (Lohregel, 2012)

Bei der Zentrifugalextraktion werden zwei Phasen mit unterschiedlichen Dichten gemischt und im Anschluss im Zentrifugalfeld getrennt. Dabei gibt es verschiedene Betriebsweisen. Zum einen kann die Zentrifugalextraktion in einer Mischer-Scheider-Einheit erfolgen, zum anderen gibt es Differentialkontaktler, die Misch- und Trennstufe zu einer Einheit vereinen. Bei Letzteren kann die Strömung sowohl axial als auch radial geführt werden. (Gebauer *et al.*, 1982)

Vorteile von Zentrifugalextraktoren gegenüber anderen Flüssig-Flüssig-Extraktoren sind unter anderem die geringen Kontaktzeiten, der geringe Platzbedarf, die niedrigen Volumina im Extraktor, der hohe Durchsatz sowie die flexiblen Phasenverhältnisse. Darüber hinaus führt die Trennung der verwendeten Phasen zu einer Nutzbarmachung von Phasen mit geringen Dichteunterschieden und damit zu mehr Kombinationsmöglichkeiten von Lösemitteln. Zudem können sogar Phasen verwendet werden, die zur Emulsionsbildung neigen. Bei Nachteilen handelt es sich um hohe Investitions- und variable Kosten sowie hohe Drücke. Die Betriebskosten entstehen dabei vor allem durch Wartung, Verschleiß und den Energieaufwand. (Baier, 1999; Gebauer *et al.*, 1982; Schönbacher, 2002; Schügerl, 1994)

Eine schematische Darstellung eines Differentialkontaktlers (vgl. Meikrantz *et al.* (2001)) ist in Abbildung 3.12 gezeigt.



**Abbildung 3.12:** Schematischer Aufbau eines Differential-Zentrifugalextraktors (nach Kurzrock (2010)). Die schwere (dunkelgrau) und leichte Phase (hellgrau) werden in den Zentrifugalextraktor eingeleitet, vermischen sich zwischen Rotor und Gehäuse zur Mischphase (grau) und werden ebenfalls durch Rotation wieder getrennt.

Die leichte und die schwere Phase werden kontinuierlich und tangential durch die dafür vorgesehenen Einlässe zusammengeführt. Die Dispersion der Phasen erfolgt im Anschluss in der Mischzone zwischen



der feststehenden Gehäusewand und dem drehenden Rotor. Die so erzeugte hohe Phasengrenzfläche führt zu einer effizienten Extraktion. Durch das kontinuierliche Einleiten beider Phasen erfolgt die Flussrichtung der Dispersion zunächst zum Gehäuseboden. An diesem Boden befestigte Stege leiten die Flüssigkeit im Anschluss weiter in Richtung der Rotationsachse. Die vorliegenden Strömungsverhältnisse in dem Spalt zwischen zwei rotierenden Zylindern werden als Taylor-Couette-Strömung bezeichnet. Im Zentrifugalextraktor liegt mit außen unbeweglichem und innen rotierendem Zylinder ein Spezialfall vor. Je nach Taylor-Zahl sind im Spalt verschiedene Strömungsprofile bekannt. Die Taylor-Zahl stellt das Verhältnis von Zentrifugalkraft zu Zähigkeitskraft dar (Sha *et al.*, 2016) und wird mit Gleichung 3.21 beschrieben.

$$Ta = \frac{4 \cdot \Omega_i^2 \cdot d^4 \cdot (\vartheta - \eta^2)}{\nu^2 \cdot (\eta^2 - 1)} \quad \text{Gleichung 3.21}$$

- $\Omega_i$ : Winkelgeschwindigkeit des inneren Zylinders,  $s^{-1}$
- $d$ : Spaltbreite, m
- $\vartheta$ : Drehzahlverhältnis, -
- $\eta$ : Verhältnis der Radien, -
- $\nu$ : kinematische Viskosität,  $m^2 s^{-1}$

Liegt die Taylor-Zahl unter dem kritischen Wert 1708, strömt die Flüssigkeit laminar entsprechend einer Couette-Strömung. Wird die kritische Taylor-Zahl ( $Ta_{kr}$ ) erreicht und überschritten, findet die Bildung von Taylor-Wirbeln statt, die senkrecht zur Rotationsachse stehen. Bei steigender Taylor-Zahl kommt es zunächst zu Wellenströmungen, im Anschluss wird die Strömung quasiperiodisch und abschließend schwach turbulent. Liegt die Taylor-Zahl bei  $\geq 1000 Ta_{kr}$  treten turbulente Taylor-Wirbel auf. Zusätzlich muss für Zentrifugalextraktoren berücksichtigt werden, dass durch die eingeleiteten Phasen weitere Strömungen entstehen. Verschiedene Veröffentlichungen konnten fluiddynamische Simulationen mit experimentellen Messungen vergleichen und die Strömungsprofile und Verweilzeitverhalten im einphasig betriebenen Spalt des Zentrifugalextraktors sowie der Region unter dem Rotor bestätigen. Die Reynoldsspannungsmodelle wurden für einen weiten Bereich von Taylor-Zahlen als geeignet ermittelt. Darüber hinaus konnte der Wechsel von laminarer Couette-Strömung zu Taylor-Wirbeln bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass Stege am Boden zu einer Erhöhung der Turbulenz und der Rückvermischung führen. Die Rückvermischung konnte durch schnellere Volumenströme der Phasen verringert werden, stieg jedoch bei höheren Drehzahlen an. Möglichkeiten zur weiteren Senkung der Rückvermischung sind spiralförmige Leitbleche im Spalt zwischen den Zylindern oder eine Verringerung der Spaltbreite. (Deshmukh *et al.*, 2007; Deshmukh *et al.*, 2008; Deshmukh *et al.*, 2009; Tamhane *et al.*, 2012)

Diese Beobachtungen gelten jedoch vor allem für einphasige Strömungen. Werden zwei Phasen betrachtet, können zwei verschiedene Fälle auftreten. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass beide Phasen ihre Integrität beibehalten, radial geschichtet vorliegen und somit nur eine definierte Kontaktfläche besteht. Die zweite Alternative besteht in einer Dispersion einer Phase, die Tropfen in der anderen Phase bildet (Vedantam & Joshi, 2006). Zu den Variablen, die den Extraktionsvorgang charakterisieren, gehören unter anderem der Volumenanteil der dispersen Phase am Gesamtvolumen (*Hold-up*), die Verweilzeitverteilung, das Phasenverhalten sowie die Tropfengrößenverteilung. Die Verteilung der Phasen in der Zentrifugeneinheit ist stark abhängig von den physikalischen Eigenschaften der eingesetzten Flüssigkeiten, wobei die dichteste Phase im größeren Teil vorliegt. Der Dichteunterschied beeinflusst die Auswahl der Wehrscheibe und verändert damit ebenfalls das Verhältnis des *Hold-ups*.

Eine Öffnung erlaubt den beiden Phasen nach der Vermischung den Eintritt in die Rotorkammer, die in vier Teile unterteilt ist. Die dazu eingebauten Schaufeln beschleunigen die Rotationsbewegung der Dispersion, wodurch sich die ineinander gemischten Phasen aufgrund ihres Dichteunterschieds trennen. Die sich außen sammelnde schwere Phase fließt an der Gehäusewand durch ein außenliegendes Wehr aus dem Zentrifugalextraktor. Die leichte Phase sammelt sich nahe der Rotationsachse und wird über eine passend gewählte Wehrscheibe ausgetragen. An der Rotationsachse entsteht eine Luftsäule. Auch die Strömung im Rotor ist fluiddynamisch geklärt (Wardle *et al.*, 2009). Eine Anpassung der Wehrscheibe erfolgt je nach Dichteunterschied der Phasen. Der maximale Durchsatz wird überschritten, sobald eine Verunreinigung der Phasen stattfindet (Leonard *et al.*, 1980). Eine verbesserte Phasentrennung kann besser durch eine Verlängerung der Verweilzeit statt durch eine Erhöhung der Zentrifugalkraft durch Steigerung der Drehzahl erreicht werden. Mögliche Methoden sind also die Verringerung der Volumenströme oder aber eine Vergrößerung der Zentrifugeneinheit. (Meikrantz *et al.*, 2001)

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Mikroorganismen

Bei den verwendeten Mikroalgen handelte es sich um verschiedene Stämme der Art *Dunaliella salina* aus der Gattung *Dunaliella*. Diese Mikroalge gehört in der Abteilung der Chlorophyta zur Klasse Chlorophyceae und der Ordnung Volvocales (van den Hoek *et al.*, 1993).

***D. salina* CCAP19/18** wurde von der *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP) bezogen. Der Stamm wurde erstmals von Kaethner 1982 aus hypersaliner Sole der Hutt Lagoon in Australien isoliert. Der Stamm ist also in der Lage hohe Salzkonzentrationen zu tolerieren.

Der zweite Stamm – ***D. salina* SAG42.88** – wurde von der Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) mit bakteriellen Kontaminationen bezogen. Er stammt aus einer Saline nahe der Bardawil Lagune in Israel.

***D. salina* SAG19-3** wurde ebenfalls mit bakteriellen Verunreinigungen bei der SAG bezogen und entstammt ursprünglich einem Salzsee in Russland.

Die Herkunft von ***D. salina* SAG184.80** ist nicht näher bekannt. Auch dieser Stamm wurde bei der SAG bezogen und lag axenisch vor.

### 4.2 Kultivierung von Mikroalgen

In diesem Kapitel werden die zur Kultivierung von Mikroalgen verwendeten Medien und Photobioreaktoren beschrieben. Dabei wird näher auf die Stammkulturhaltung, die Vorkulturherstellung in Blasensäulenreaktoren sowie die Durchführung von Satzprozessen im Labormaßstab in Flachplatten-Photobioreaktoren und im Pilotmaßstab in Flachgerinnereaktoren eingegangen.

#### 4.2.1 Verwendete Medien

Alle verwendeten Medien basieren auf der Zusammensetzung des „BG11“-Mediums sowie der Spurenelementlösung „A5“ nach Waterbury & Stanier (1981). Das „BG11“-Medium sowie die verwendeten Variationen sind zusammen mit der verwendeten Spurenelementlösung in Tabelle 4.1 dargestellt.

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzung der hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Medien „BG11 2N 2P“, „BG11+“, „BG11 Biomass“, und „BG11 Produktion“ die auf dem „BG11“-Medium und der Spurenelementlösung „A5“ nach Waterbury & Stanier (1981) beruhen.

| Komponente                             | Konzentration, mg L <sup>-1</sup> |            |       |              |                 |
|--|-----------------------------------|------------|-------|--------------|-----------------|
|  | BG11                              | BG11 2N 2P | BG11+ | BG11 Biomass | BG11 Produktion |
| NaNO <sub>3</sub>                      | 1500                              | 3000       | 6000  | 3750         | 375             |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 40                                | 80         | 80    | 240          | 10              |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 75                                | 75         | 150   | 600          | 19              |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 36                                | 36         | 36    | 36           | 36              |
| Zitronensäure                          | 6                                 | 6          | 6     | 6            | 6               |
| Na-EDTA                                | 1                                 | 1          | 1     | 1            | 1               |
| Ammoniumeisen(III)-Citrat              | 6                                 | 6          | 6     | 12           | 6               |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>        | 20                                | 20         | 20    | 20           | 20              |

| Komponente   | Spurenelementlösung 1 mL L <sup>-1</sup> |                      |                      |                      |                      |
|--|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|  | 1 mL L <sup>-1</sup>                     | 1 mL L <sup>-1</sup> | 1 mL L <sup>-1</sup> | 1 mL L <sup>-1</sup> | 1 mL L <sup>-1</sup> |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         |  |                      |                      | 2860                 |                      |
| MnCl · 4 H <sub>2</sub> O                              |  |                      |                      | 1810                 |                      |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 |  |                      |                      | 222                  |                      |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O  |  |                      |                      | 39                   |                      |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 |  |                      |                      | 79                   |                      |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O |  |                      |                      | 49.4                 |                      |

Von allen Komponenten wurden stark konzentrierte Lösungen hergestellt, die bis zu Verwendung bei 4 °C gelagert wurden. Um ein Ausfallen verschiedener Substanzen zu vermeiden, wurden die Medienbestandteile unmittelbar vor Versuchsstart zusammengeführt.

#### 4.2.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte in 150 mL „BG11“-Medium mit einer Salzkonzentration von 50 g L<sup>-1</sup> in 500 mL Schüttelkolben bei einer Photonenflussdichte von  $83 \pm 17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sowie einer Temperatur von 25 °C in einem modifizierten Inkubator (Profors, Infors HT, Bottmingen, Schweiz). Die Durchmischung der Kolben erfolgte täglich manuell. Die sterile Überführung in frisches Medium erfolgte regelmäßig alle zwei Monate.

#### 4.2.3 Vorkulturherstellung in Schüttelkolben

Um eine ausreichende Menge an Biomasse zu gewährleisten, wurden 500 mL Schüttelkolben mit 150 mL „BG11“-Medium (35 g L<sup>-1</sup> NaCl) mit 10 mL Algensuspension aus der Stammkultur beimpft und

bei 150 rpm und einer Eingangspotonenflussdichte von  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in einem Schüttelinkubator (WiseCube® WIS-20R, witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland) inkubiert. Die Beleuchtung der Algen erfolgte mit einem LED-Modul (Tesla-S-LED-Modul, 84 W, Giesemann Lichttechnik und Aquaristic GmbH, Nettetal, Deutschland).

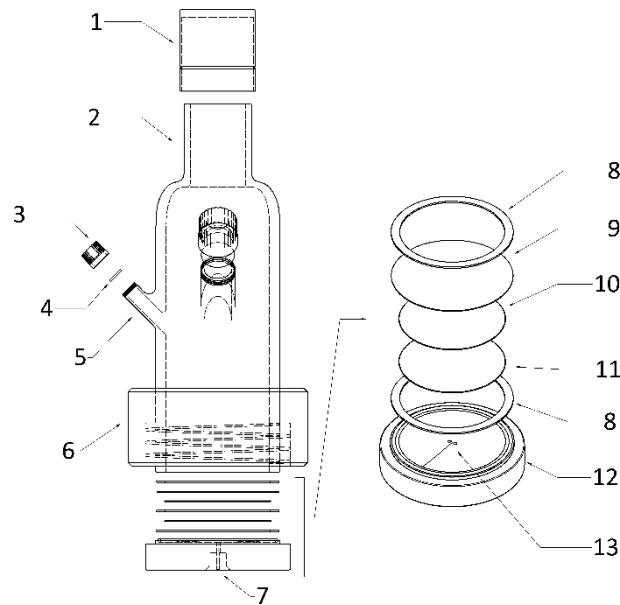
#### 4.2.4 Vorkulturherstellung in Blasensäulenreaktoren

Die Vorkulturen für die Satzprozesse in Flachplatten-Photobioreaktoren wurden in Blasensäulenreaktoren hergestellt (Altenbach-Rehm *et al.*, 1999; Weuster-Botz & Altenbach-Rehm, 1996). Dieser Photobioreaktor ermöglichte die parallele Kultivierung in bis zu 16 Blasensäulenreaktoren.

##### **Aufbau zur Vorkulturherstellung**

Die Vorkulturherstellung fand in einem modifizierten Inkubator (Profors, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) statt, dessen Schütteleinsatz durch eine Gasverteilerplatte mit Ventilen für Blasensäulenreaktoren ersetzt wurde. Ein schematischer Aufbau des modifizierten Inkubators ist im Anhang dargestellt (vgl. Abbildung A.1). Die Temperierung erfolgte über einen externen Durchlaufkühler DLK60 bzw. DLK402DP (Fryka Kältetechnik, Esslingen, Deutschland). Die Begasung fand durch konische Durchführungen in die Blasensäulen mit Druckluft statt, der über eine Gasmischstation WMR 4000 (Westphal/Brooks Instruments, Dresden, Deutschland)  $\text{CO}_2$  beigemischt wurde. Zur Beleuchtung diente eine Kombination aus Leuchtstoffröhren der Typen Fluora L77 (Osram, München, Deutschland) sowie Sun-Glo (Hagen, Holm, Deutschland).

Der Aufbau eines Blasensäulenreaktors ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Das Glasgefäß, das gleichzeitig den Reaktionsraum des Blasensäulenreaktors darstellt (2), wurde mit einer Aluminiumkappe (1) verschlossen, die einen Überdruckausgleich zuließ, gleichzeitig aber auch als Sterilbarriere diente. Die Probenahmestutzen wurden mit Septum (4) und Lochkappe (3) verschlossen und konnten zur Probenahme verwendet werden. Das Gas gelangte durch die Bohrungen (13) der Bodenplatte (7, 12) über eine PTFE-Membran (11) sowie einen Trenneinsatz (10) zur lasergebohrten Gasverteilerplatte (9), an der das Gas durch  $60 \mu\text{m}$  Poren in die Flüssigphase dispergiert wurde. Zur Abdichtung waren zusätzlich zwei O-Ringe (8) notwendig.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung eines Blasensäulenreaktors mit Detailansicht des Bodenaufbaus (Pfaffinger, 2017). **1:** Aluminiumdeckel, **2:** Glasgefäß (Reaktionsraum), **3:** Lochkappe, **4:** Septum, **5:** Probenahmestutzen, **6:** Standfuß mit Feder, **7:** Bodenplatte mit Öffnung, **8:** O-Ring, **9:** lasergebohrte Gasverteilerplatte (Porengröße: 60  $\mu\text{m}$ ), **10:** Trenneinsatz, **11:** PTFE-Membran, **12:** Bodenplatte mit Dichtungsring, **13:** Bohrungen für Gaseintrag.

### Betrieb der Blasensäulenreaktoren

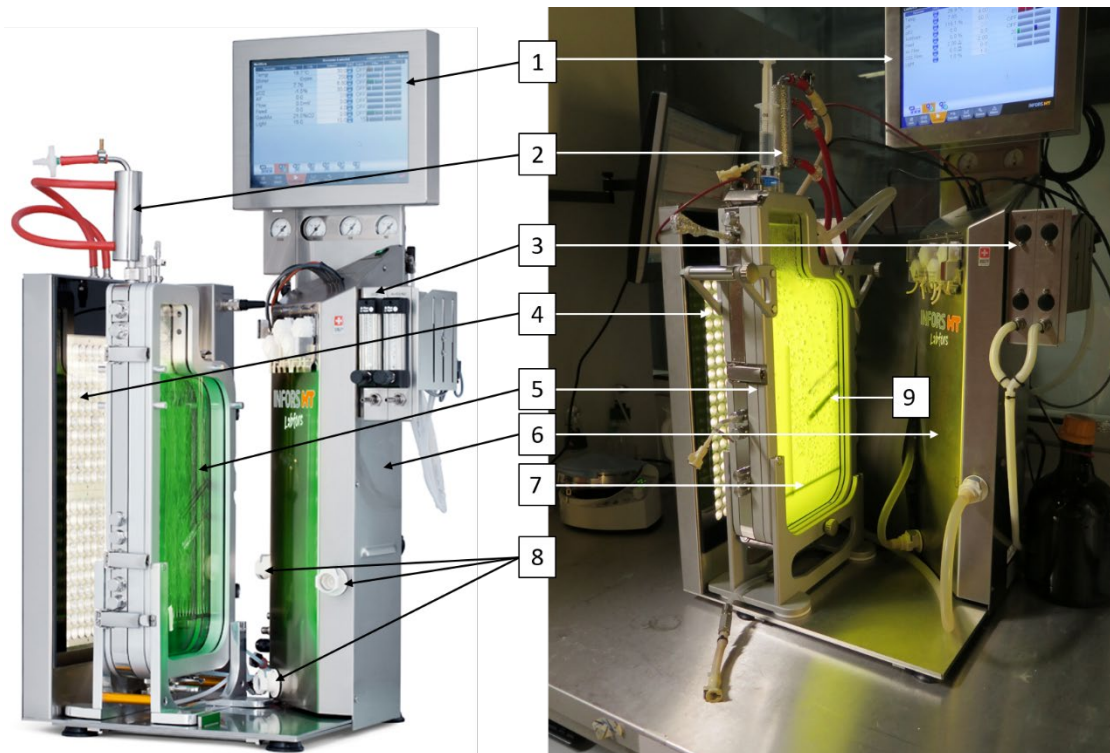
Die Blasensäulenreaktoren wurden zur Vorkulturherstellung mit „BG11“-Medium ( $35 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) befüllt und mit etwa 20 mL der Stammkultur oder Vorkultur aus Schüttelkolben inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , einer Begasung von ca.  $10 \text{ L h}^{-1}$  und einer Photonenflussdichte von  $83 \pm 17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Zur Begasung wurde ein Gasgemisch aus 99 % (v/v) Druckluft und 1 % (v/v)  $\text{CO}_2$  genutzt. Etwaige Verdunstung wurde bei Bedarf mit vollentsalztem Wasser ausgeglichen. Das Inokulum wurde nach etwa zwei Wochen Prozesszeit entnommen und konnte zur Inokulation sowohl der Flachplatten-Photobioreaktoren als auch frischer Blasensäulenreaktoren verwendet werden.

#### 4.2.5 Satzprozesse in Flachplatten-Photobioreaktoren

Die durchgeführten Satzprozesse zur reaktionstechnischen Charakterisierung von *D. salina* im Labormaßstab wurden in Flachplatten-Photobioreaktoren des Typs Labfors 5 Lux (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt.

### Aufbau der Flachplatten-Photobioreaktoren

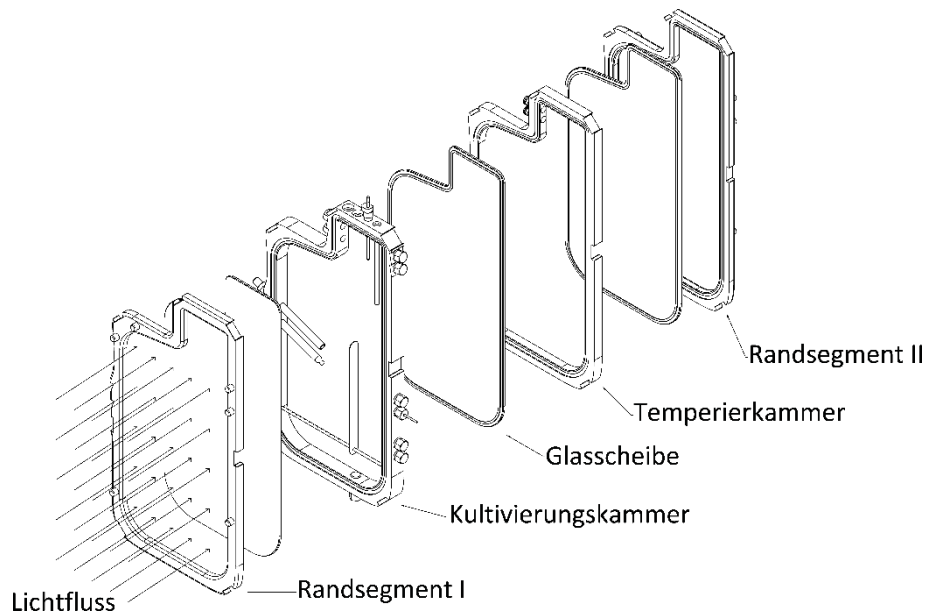
Der verwendete Flachplatten-Photobioreaktor ist in Abbildung 4.3 gezeigt und setzte sich aus einem Kultivierungsgefäß (5), einem Grundgerät (6) mit Bedieneinheit (1), sowie einer Bestrahlungseinheit (4) – dem LED-Paneel – zusammen.



**Abbildung 4.2:** Aufbau des Flachplatten-Photobioreaktors Labfors Lux 5 zur Kultivierung von Mikroalgen im Labormaßstab. **1:** Bedieneinheit; **2:** Abluftkühler; **3:** Massendurchflussregler; **4:** LED-Bestrahlungseinheit; **5:** Kultivierungsgefäß; **6:** Grundgerät; **7:** Begasungsrohr; **8:** Wasseranschlüsse für Temperierkammer; **9:** pH- und  $pO_2$ -Sonde.

Das Grundgerät enthielt neben der Bedieneinheit alle zur Mess- und Regelungstechnik relevanten Bauteile. Dazu zählen unter anderem Manometer, Druckreduzierventile, Sensorkabel für Temperatur-, pH- und  $pO_2$ -Sonden (9) und Pumpen für Säure, Base und Zulauf. Darüber hinaus waren seitlich am Grundgerät Massendurchflussregler (3) für  $CO_2$  und Druckluft montiert. Zusätzlich beinhaltet das Grundgerät die Pumpen zur Temperierung der Kühlflüssigkeit. Da intern nur Heizen möglich ist, wurde ein externes Kühlgerät DK1800 (Wutke, Schutterwald, Deutschland) genutzt, um einen ausreichenden Wärmeabtransport von den Reaktoren zu gewährleisten. Der Austausch der Kühlflüssigkeit zwischen Grundgerät und Kultivierungskammer fand über die Wasseranschlüsse am Grundgerät (8) statt. Die Gasmischung von Druckluft und  $CO_2$  fand durch Massendurchflussregler (3) statt, wobei der Anteil an  $CO_2$  zwischen 0-10 % (v/v) betrug. Zur Durchmischung wurde das Gas durch ein Begasungsrohr (7) in die Zellsuspension eingetragen. Ein Abluftkühler (2) sollte den Austrag von Flüssigkeit vermeiden.

Das Kultivierungsgefäß war in eine dem LED-Panel zugewandte Kultivierungskammer und eine dem Licht abgewandte Temperierkammer unterteilt. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 4.3 gezeigt.



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des Kultivierungsgefäßes eines Flachplatten-Photobioreaktors des Typs Labfors 5 Lux (Pfaffinger, 2017).

Kultivierungskammer und Temperierkammer wurden gegeneinander und nach außen hin von 5,5 mm dicken Borosilikat-Sicherheitsglasscheiben abgetrennt. Die Randsegmente umschlossen den gesamten Zusammenbau. Um eine Abdichtung zu erreichen, war ein Einbau von Gummidichtungen zwischen allen Segmenten und Glasscheiben notwendig. Die Befestigung erfolgte mit Klemmen an den Randsegmenten.

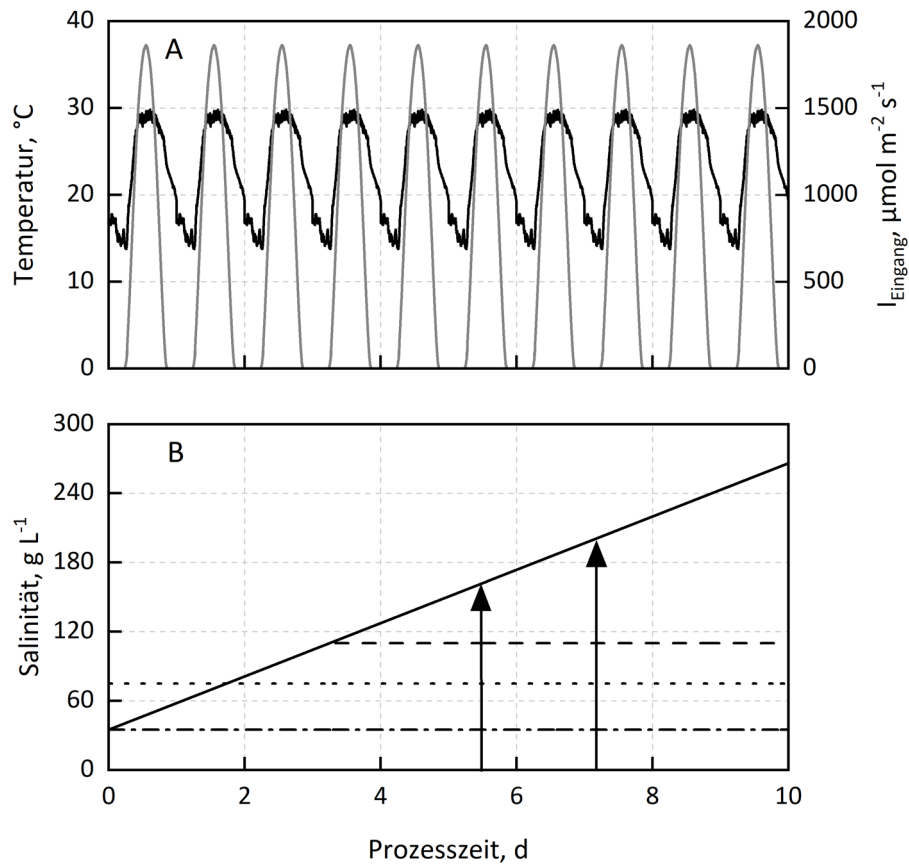
Die Bestrahlungseinheit bestand aus Leiterplatten mit 260 Hochleistungs-LEDs und Reflektoren, die in einem Edelstahlgehäuse verbaut sind. Zur Abdeckung diente eine Plexiglasscheibe. Die Kühlung der Leiterplatten erfolgte durch einen weiteren Kühlkreislauf mit einem externen Kühler DK2700 (Wutke, Schutterwald, Deutschland).

### Betrieb der Flachplatten-Photobioreaktoren

Die Satzprozesse zur Charakterisierung von *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren wurden mit den in Tabelle 4.1 gezeigten Medien durchgeführt. Zunächst wurde das Kultivierungsgefäß an das Grundgerät angeschlossen und mit Medium befüllt. Die Inokulation erfolgte mit Zellen aus den in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Blasensäulen nach Zentrifugation (10 min, 3260 g, Rotixa 50RS, Hettich, Tuttlingen) und Resuspendieren in frisches Medium mit einer Zelldichte zwischen 0,01-0,6 g<sub>B<sub>TM</sub></sub> L<sup>-1</sup>. Bei Kultivierung in einem zweistufigen Prozess wurde zunächst eine Wachstumsphase analog zu einem Satzprozess durchgeführt. Die Zellsuspension wurde an dessen Ende entnommen, zentrifugiert (10 min, 3260 g, Rotixa 50RS, Hettich, Tuttlingen) und nach Resuspendieren in frischem Medium als Inokulum für eine an die Wachstumsphase anschließende Produktionsphase verwendet. Die gewählten Tagesganglinien von Licht und Temperatur wurden aus Daten aus Almería (Spanien)



abgeleitet. Die Verläufe von Temperatur und Eingangsphotonenflussdichte sind in Abbildung 4.4A zusammengefasst. Zusätzlich wurde der Einfluss einer Erhöhung der Salinität untersucht. Deren verschiedene Verläufe sind in Abbildung 4.4B zusammengefasst.

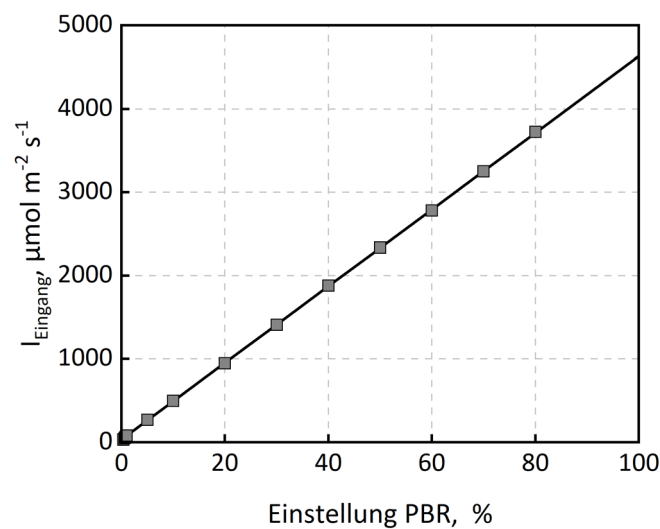


**Abbildung 4.4:** Verlauf von Temperatur (schwarz) und Eingangsphotonenflussdichte (grau) des 15. Juni 2012 in Almería, Spanien (A, Stefan Wilbert, DLR, Plataforma Solar de Almería) sowie verschiedener Verläufe der Salinität (B). Bei einer Steigung von  $23,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , die durch Verdunstungsausgleich mit Meerwasser in Flachgerinnereaktoren auftritt, steigt die Salinität innerhalb von zehn Tagen von  $35 \text{ g L}^{-1}$  auf  $270 \text{ g L}^{-1}$  (durchgezogene Linie). Die Referenz mit Ausgleich der Verdunstung durch Frischwasser weist eine konstante Salinität von  $35 \text{ g L}^{-1}$  (strichpunktierte Linie) auf. Zusätzlich wurde eine Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  (gestrichelte Linie) durchgeführt. Für Vergleichsversuche zwischen Pilotmaßstab und Labormaßstab wurde eine Salinität von  $75 \text{ g L}^{-1}$  (gepunktete Linie) genutzt. Die Pfeile markieren Zeitpunkte, zu denen Algenbiomasse geerntet wurde. Hier wurden Salinitäten von  $160$  bzw.  $200 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  erreicht.

Die Eingangsphotonenflussdichte lag zwischen  $0$  und  $1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die Temperatur variierte laut Klimadaten zwischen  $15$  und  $30 \text{ °C}$ . Die Klimadaten wurden zur Integrierung in die IRIS-Software mit einem Polynom 3. Ordnung für die Temperatur ( $R^2 > 0,98$ ) und einem Polynom 4. Ordnung für das Licht ( $R^2 > 0,999$ ) abgebildet. Um den Einfluss der Temperatur zu ermitteln, wurde das Temperaturintervall zusätzlich um  $5 \text{ °C}$  erhöht. Die Salinitätserhöhung wurde aus den Verdunstungsraten sowie dem Verdunstungsausgleich mit Meerwasser mit einer Salinität von  $35 \text{ g L}^{-1}$  in Flachgerinnereaktoren errechnet (Apel *et al.*, 2017). Die Steigung der Salzkonzentration in Höhe von  $23,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  führte innerhalb von zehn Tagen Prozesstagen zu einem Anstieg der Salinität von  $35$  auf  $270 \text{ g L}^{-1}$ . Ein

Verdunstungsausgleich mit Frischwasser lieferte eine konstante Salinität von  $35 \text{ g L}^{-1}$ . Darüber hinaus wurde die Salinität mit einer Steigung von  $23,1 \text{ g L}^{-1}$  innerhalb von 3,7 d auf  $110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl gesteigert und bei dieser Salinität konstant gehalten. Der pH wurde zwischen 8 und 9 variiert und durch die im Anhang (vgl. Kapitel A.2.2) gezeigte Sequenz zur Steuerung des  $\text{CO}_2$ -Anteils am Gasvolumenstrom konstant gehalten. Der aus  $\text{CO}_2$  und Druckluft zusammengesetzte Gesamtvolumenstrom betrug stets  $2,0 \text{ NL min}^{-1}$ .

Um die Eingangsphtonenflussdichte mit dem jeweiligen LED-Panel korrekt wiedergeben zu können, wurde hinter der ersten Glasscheibe eine Korrelation mit der Einstellung der Lichtintensität an der Bedieneinheit ermittelt. Diese musste für jede Station separat bestimmt werden. Eine beispielhafte Korrelation ist in Abbildung 4.5 gezeigt.



**Abbildung 4.5:** Beispielhafte Korrelation zwischen der eingestellten Lichtstärke an der Bedieneinheit des Flachplatten-Photobioreaktors in % und der auf die Algenkultur treffenden Eingangsphtonenflussdichte  $I_{\text{Eingang}}$  in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Korrelation:  $I_{\text{Eingang}} = 45,997 \cdot I_{\text{Set}} + 34,424$ ;  $R^2 = 1$ ).

Tagsüber wurden eine bis sechs Proben entnommen und je nach Anforderung unterschiedlich verarbeitet. In Satzprozessen mit Salzsteigerung wurden dem Medium sechsmal am Tag  $8,4 \text{ g NaCl}$  hinzugefügt, um die erwünschte Salzsteigerung zu gewährleisten. Das Probevolumen wurde mit dem jeweilig genutzten Medium ausgeglichen, etwaige Verdunstungsausgleiche wurden mit vollentsalztem Wasser durchgeführt.

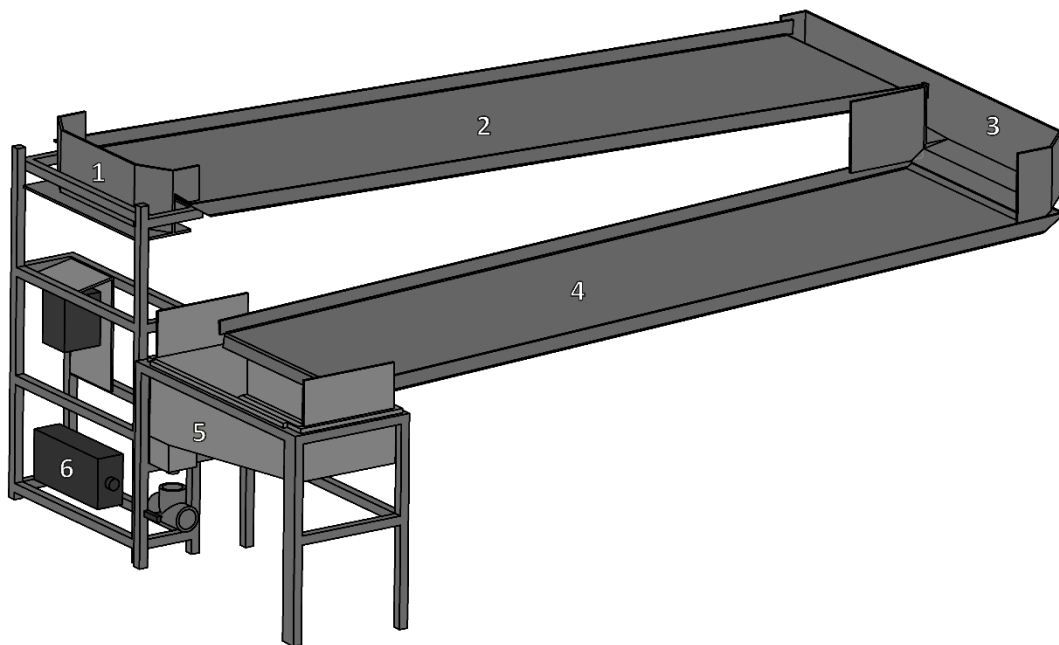
#### 4.2.6 Satzprozesse in Flachgerinnereaktoren

Die Satzprozesse zur Übertragung in einen offenen Photobioreaktor wurden in Flachgerinnereaktoren durchgeführt, die von Andreas Apel am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität

München entwickelt wurden (Apel, 2017). Die verwendeten Reaktoren waren im Algentechnikum auf dem Ludwig-Bölkow-Campus in Ottobrunn installiert.

### Aufbau der Flachgerinnereaktoren

Der Flachgerinnereaktor ist in Abbildung 4.6 dargestellt und bestand aus einem Einlaufbecken (1), durch das die Zellsuspension auf das erste Gerinne (2) gelangte. Im Wendebecken (3) wurde die Zellsuspension anschließend gemischt und umgelenkt und auf ein zweites Gerinne (4) verteilt. Aus dem Sammelbecken (5) wurde die Zellsuspension im Anschluss über eine durch einen Frequenzumrichter ansteuerbare Pumpe (6) wieder in das Einlaufbecken gefördert. Beide Gerinne waren 3,5 m lang und 1,0 m breit und in einer Neigung von 1,7 % eingestellt. Die Bauteile bestanden aus Polyethylen hoher Dichte (PE-HD), um chemische und mechanische Stabilität aufzuweisen.



**Abbildung 4.6:** Schematischer Aufbau eines Flachgerinnereaktors (Abbildung von Andreas Apel). **1:** Einlaufbecken, **2:** erstes Gerinne, **3:** Wendebecken, **4:** zweites Gerinne, **5:** Sammelbecken, **6:** Pumpe. Sowohl Gestell als auch LED-Anlage sind hier nicht dargestellt.

Bei der ursprünglich verbauten Pumpe (6) handelte es sich um eine Magnetkreislumpumpe (Sondermann Pumpen und Filter GmbH & Co.KG, Köln, Deutschland). Verschiedene Mikroalgenstämme sind nicht in der Lage bei Verwendung einer Kreislumpumpe zu wachsen (Michels *et al.*, 2016). Bei der Förderung durch eine Kreislumpumpe kommen sich bewegende Kanten der Laufradschaufeln mit der Algensuspension in Berührung. An diesen Kanten tritt die maximale lokale Energiedissipation im Inneren der Kreislumpumpe auf. Die so entstehende höhere lokale Energiedissipation kann zur Schädigung von Zellen führen. Bei einer Schlauchpumpe hingegen wird der Schlauch, durch den die Algensuspension gefördert wird, durch Rollen abgeklemmt. Die durch Bewegung der Rollen stattfindende Förderung kann so schärmer stattfinden. Daher wurde zusätzlich im umgerüsteten

Betrieb eine Schlauchpumpe (Verderflex ROLLIT 50, Verder Deutschland GmbH & Co.KG, Haan, Deutschland) verwendet, um eine schärmerere Förderung der Zellen zu gewährleisten.

Durch einen Füllstandssensor konnte das ursprüngliche Volumen konstant gehalten werden. Darüber hinaus wurde der CO<sub>2</sub>-Eintrag sowie die Regelung des pH durch einen porösen Schlauch (Solvocarb®, Linde AG, München, Deutschland) im Sammelbecken gewährleistet. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Kombination aus LED-Licht und natürlichem Sonnenlicht, das durch das Glasdach des Algentechnikums auf die Reaktoroberfläche trifft. Die LED-Anlage (FutureLED GmbH, Berlin, Deutschland) war über den Reaktoren angebracht. Die Temperierung der Zellsuspension erfolgte über die Regulierung der Temperatur der Raumluft im Algentechnikum durch eine speziell ausgelegte Klimaanlage.

### **Betrieb der Flachgerinnereaktoren**

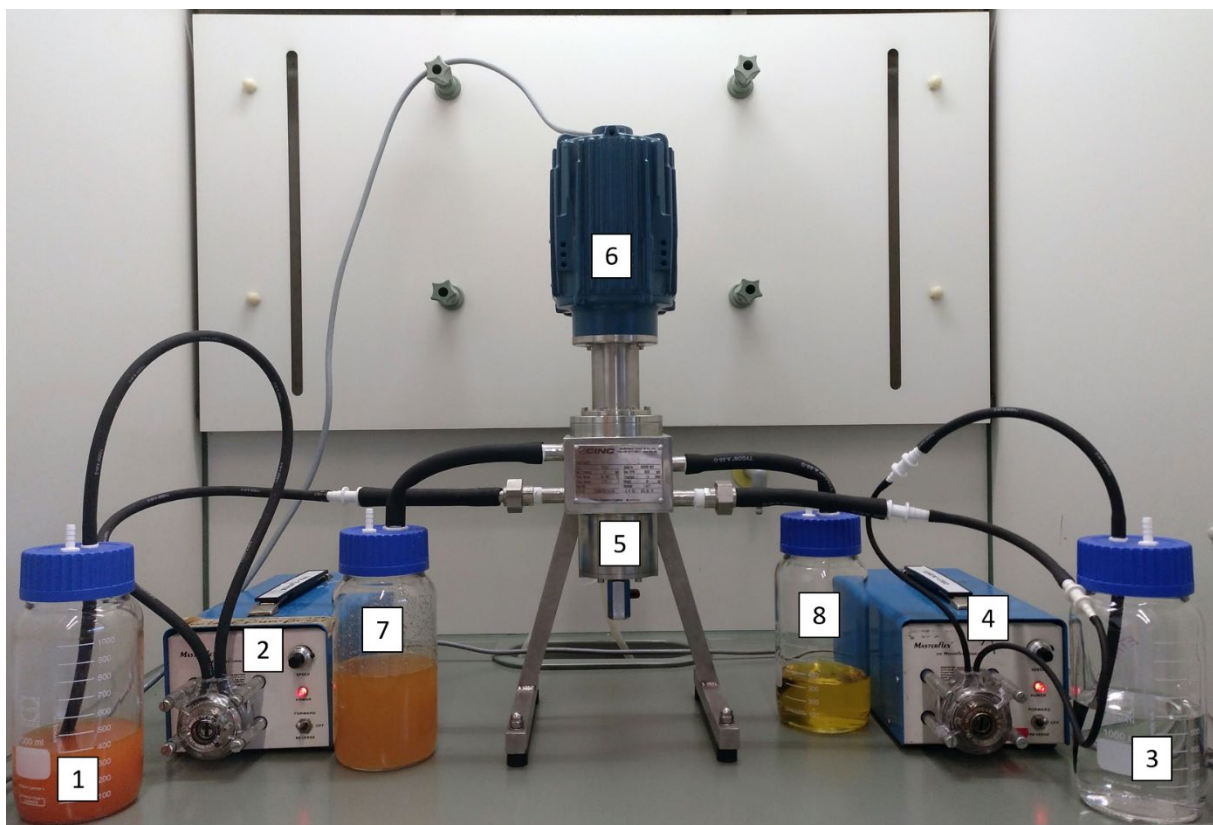
Die Reaktoren wurden mit einem Arbeitsvolumen von 55 L „BG11 2N 2P“-Medium (vgl. Tabelle 4.1) bei einer Salinität von 75 g L<sup>-1</sup> bei pH 7,5 betrieben, wobei die photosynthetisch aktive Fläche 8 m<sup>2</sup> betrug. Zunächst wurde Sole mit der gewünschten Salinität vorgelegt, in die die Medienbestandteile als Feststoffe zugegeben wurden. Die Klimabedingungen entsprachen den in Flachplatten-Photobioreaktoren verwendeten Daten in Abbildung 4.4A. Da aufgrund der verringerten Schichtdicke im Flachgerinnereaktor mit Lichtinhibierung zu rechnen war, wurde zwar die Dynamik der Eingangsphtonenflussdichte des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien) beibehalten, jedoch wurde die Stärke teilweise auf 10-90 % reduziert. In Flachgerinnereaktoren erfolgte keine Annäherung der Daten durch Polynome. Das Inokulum wurde Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren mit derselben Salinität und gleichem pH entnommen (vgl. Kapitel 4.2.5). In Photobioreaktoren können Scherspannungen auf Algen wirken, die das Wachstum negativ beeinflussen. Gerade bei der Zerstörung von dünnen Flüssigkeitsfilmen wie bei Gasblasen an der Flüssigkeitsoberfläche, in denen sich Zellen befinden, treten Zellschädigungen auf (Marks, 2003). Zusätzlich kann es an Kanten und bei Verringerungen bzw. Erhöhungen des Durchmessers durchströmter Bauteile zu hohen lokalen Energiedissipationen kommen. Eine Möglichkeit, die auf Algenzellen wirkenden Scherspannungen zu vermindern, ist die Zugabe scherprotektiver Agenzien. Die Polaxamer-Mischung Pluronic F-68 ist ein nicht-ionisches Tensid, das bei der Kultivierung von Zellkulturen zur Verringerung von Zellen in den Filmen von Gasblasen beiträgt und so negative Effekte beim Platzen der Gasblasen vermindert (Heath & Kiss, 2007). Zusätzlich führte die Zugabe von Pluronic F-68 aber auch in einer Gasblasen-freien Umgebung zu Schutz vor Schädigungen durch Scherspannungen. Dieser zweite Effekt ist vermutlich auf die Anlagerung von Pluronic F-68 an die Zellen zu führen, was zu einem Schutz führen kann (Tharmalingam *et al.*, 2008). Auch Carboxymethylcellulose ist dafür bekannt, den Einfluss von Scherspannungen auf Mikroalgen sowohl bei Gasblasenbildung als auch bei Leistungseintrag durch Schütteln zu verringern (Camacho *et al.*, 2001; Gallardo Rodríguez *et al.*, 2011). Bei einigen

Satzprozessen im Flachgerinnereaktor wurden Pluronic F-68 (0,01 % (v/v)) und Carboxymethylcellulose (0,02 % (w/v)) eingesetzt, wie bereits in der Literatur beschrieben (Camacho *et al.*, 2001; Gallardo Rodríguez *et al.*, 2011).

Bei übermäßiger Schaumbildung wurde den Satzprozessen 10 mL Antischaum AF 204 zugesetzt. Bei starker Biofilmbildung auf den Gerinnen wurden die Zellen mechanisch vom Gerinne gelöst. Nach jedem Satzprozess erfolgte eine Reinigung des Reaktors mit Salzsäure und Natronlauge, um anorganische und organische Ablagerungen zu entfernen.

#### 4.3 Extraktion im Zentrifugalextraktor

Die Extraktion von  $\beta$ -Carotin wurde in einem Zentrifugalextraktor des Typs V02 (auch CS50; CINC Deutschland GmbH & Co.KG, Brakel, Deutschland) untersucht, der in Abbildung 4.7 gezeigt ist.



**Abbildung 4.7:** Aufbau des Zentrifugalextraktors im Labor. **1:** Vorlagegefäß der schweren Phase (hier: Zellsuspension), **2:** Pumpe der schweren Phase, **3:** Vorlagegefäß der leichten Phase (hier: Ethylacetat), **4:** Pumpe der leichten Phase, **5:** Zentrifugalextraktor, **6:** Motor zum Betrieb des Zentrifugalextraktors, **7:** Auffanggefäß der schweren Phase (Raffinat), **8:** Auffanggefäß der leichten Phase (Extrakt).

Wird dem Verweilzeitverhalten ein *tanks-in-series*-Modell für ein ideales Strömungsrohr zugrunde gelegt, kann es in einem Zentrifugalextraktor des Typ CINC V02 am besten mit einem Totvolumen von 20 mL je Phase und sieben in Reihe geschalteten Tanks für die kontinuierliche und acht für die disperse Phase abgebildet werden. Die Phasengrenzfläche, die aus der Entstehung sehr kleiner Tropfen resultierte, lag 6-10mal höher als in einem Rührkesselreaktor (Schoor *et al.*, 2012).

Es wurde bereits gezeigt, dass bei ungleichen Flussraten beider Phasen die Stabilität des Trennvorgangs verringert wurde. Die beste Stabilität in einem Zentrifugalextraktor V02 der Firma CINC wurde bei Flussraten unter  $4 \text{ L h}^{-1}$  erreicht (Rüffer, 2004).

### **Aufbau des Zentrifugalextraktors**

Zwei peristaltische Pumpen (2, 4) fördern die schwere und leichte Phase getrennt aus zwei Vorlagegefäßen (1, 3) über Norprene-Pumpenschläuche in den Zentrifugalextraktor (5). Im Zentrifugalextraktor kommt es dann zur Vermischung beider Phasen. Die Trennung erfolgte im Zentrifugalfeld durch eine vom Motor (6) eingetragene Rotation und die Dichteunterschiede der Phasen. Die Rotationsgeschwindigkeit wurde durch einen Frequenzumrichter (VS mini J4, Omron, Kyoto, Japan) gesteuert. Die getrennten Phasen wurden hinterher in Auffanggefäßen (7, 8) gesammelt. Im Inneren des Zentrifugalextraktors konnte zudem die Wehrscheibe angepasst werden, die die Trenneigenschaften beeinflusst.

### **Betrieb des Zentrifugalextraktors**

Die Auswahl der passenden Wehrscheibe erfolgte mithilfe des Programms „WeirCalc“ anhand der Unterschiede der relativen Dichte der beiden Phasen. Mit der so ermittelten Wehrscheibe wurde zusätzlich eine experimentelle Überprüfung durchgeführt, wobei gegebenenfalls eine Anpassung erfolgte. Je nach Salinität im Medium wurden unterschiedliche Wehrscheiben eingesetzt.

Nach Einbau der gewählten Wehrscheibe sowie Rotorabdeckplatte wurde die Motorkupplung mit einer Zentralschraube und einer Madenschraube befestigt. Über die Rotorwelle konnte der Motor im Anschluss aufgesetzt werden. Zur Vermeidung zu Beginn stattfindender Verunreinigungen durch die leichte Lösemittelphase, wurde der Extraktor zunächst mit der schweren wässrigen Phase befüllt. Nach Einstellen der gewünschten Stellgrößen wurde ein vollständiger Austausch des Extraktorvolumens von ca. 200 mL verworfen, bevor die Probenahme erfolgte. Bei den untersuchten Stellgrößen des Zentrifugalextraktors handelte es sich um die Drehzahl des Rotors und die Volumenströme beider Phasen. 5 mL des jeweiligen Extrakts wurden im Rotationsverdampfer getrocknet und im Anschluss zur quantitativen Analyse per HPLC in Chloroform resuspendiert.

## 4.4 Methoden für die Modellierung des phototrophen Wachstums

Zur Beschreibung des lichtabhängigen Wachstums von *D. salina* in Flachplatten-Photobioreaktoren mit Modellansätzen ist zunächst die Untersuchung der Lichtabschwächung im Bioreaktor notwendig. Nach der Ermittlung eines spezifischen Extinktionskoeffizienten aus einem Lichtabschwächungsmodell wird die Berechnung von mittleren integralen Photonenflussdichten beschrieben.

#### 4.4.1 Bestimmung von Eingangsphotonenflussdichte und Transmission

Zur Messung der Photonenflussdichten wurde ein Spektrometer (Flame-T, Ocean Optics Inc., Florida, USA) im Bereich zwischen den Wellenlängen 400-750 nm verwendet. Um die Eingangsphotonenflussdichte korrekt einstellen zu können, wurde zunächst eine Korrelation von Lichteinstellung (in %, Labfors 5 Lux, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) und resultierender Photonenflussdichte hinter der ersten Glasscheibe aufgestellt (vgl. Abbildung 4.5). Hinter der ersten Glasscheibe wurde dabei die Photonenflussdichte gemessen, die auf die Oberfläche der Mikroalgensuspension trifft. Mit der so ermittelten linearen Korrelation wurden im Anschluss die Einstellungen bestimmt, die nötig waren, um die erwünschten Eingangsphotonenflussdichten zu erreichen.

Die Messung des Durchlichts fand an der lichtabgewandten Seite der Flachplatten-Photobioreaktoren statt. Dazu wurde eine lichtundurchlässige, mit sechs Messlöchern ausgestattete Matte auf der Scheibe platziert. Die Transmission wurde an den sechs genannten Punkten bei jeder Probenahme im Bereich der Wellenlängen zwischen 400-750 nm gemessen. Die sechs aufgenommenen Werte wurden abschließend gemittelt.

#### 4.4.2 Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Der spezifische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  wurde für jeden Satzprozess gesondert ermittelt. Da die Eingangsphotonenflussdichte  $I_0$  als Polynom 4. Ordnung beschrieben wurde (vgl. Kapitel 4.2.5) und damit zeitabhängig über den Tag variierte, wurden die in Gleichung 3.16-3.18 gezeigten Lichtabschwächungsmodelle für eine graphische Darstellung nach Gleichung 4.1 umgestellt.

$$I_{rel} = \frac{I(t)}{I_0(t)} = f(\varepsilon, c_X, l) \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$I_{rel}$  relative Photonenflussdichte, -

$I(t)$ : Photonenflussdichte nach Austritt aus dem Medium,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$I_0(t)$ : Photonenflussdichte bei Auftreffen auf die Suspensionsoberfläche,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $\text{L}^{0,5} \text{g}^{-0,5} \text{cm}^{-1}$

$c_X$ : Biotrockenmassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

$l$ : Schichtdicke, cm

Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde mit der Funktion *fit* der *Curve Fitting Toolbox* unter Gewichtung des quadratischen Variationskoeffizienten abgeschätzt ( $\text{opts.Weights} = (I_{rel}/dI_{rel})^2$ ). Die Bestimmung des 95 %-Konfidenzintervalls des Extinktionskoeffizienten erfolgte mit der Funktion *confint* (Matlab R2020a, Mathworks, Nattick, Massachusetts, USA).

Als Kriterien für die Auswahl des Modells wurden die Bestimmtheitsmaße sowie Fehlerquadratsummen herangezogen.

#### 4.4.3 Bestimmung der mittleren integralen Photonenflussdichte

Die Berechnung der mittleren integralen Photonenflussdichte bei konstanter Eingangspotonenflussdichte ist bereits bekannt (Koller *et al.*, 2017; Koller, 2017; Pfaffinger *et al.*, 2016; Pfaffinger, 2017). Treten jedoch dynamische Veränderungen der Eingangspotonenflussdichte über den Tag auf, sind Modifikationen in der Berechnung notwendig. Die Bestimmung der mittleren integralen Photonenflussdichte ist im Folgenden beispielhaft mit dem Lichtabschwächungsmodell nach Havel (Gleichung 3.17) gezeigt. In einem ersten Integrationsschritt wird nach Gleichung 4.2 die mittlere Photonenflussdichte  $I^*$  über die Schichtdicke  $L$  des Reaktors zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt.

$$I^*(L, t) = \frac{1}{L} \int_0^L I(t) dl = \frac{1}{L} \int_0^L I_0(t) \cdot e^{-\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot l} dl \quad \text{Gleichung 4.2}$$

- $I^*$ : mittlere integrale Photonenflussdichte zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $I$ : Photonenflussdichte nach Austritt aus dem Medium,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $I_0$ : Photonenflussdichte bei Auftreffen auf die Suspensionsoberfläche,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $\text{L}^{0,5} \text{g}^{-0,5} \text{cm}^{-1}$   
 $c_x$ : Biotrockenmassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $l$ : Schichtdicke, cm  
 $L$ : maximale Schichtdicke, cm

Die Tagesganglinie des Lichts des 15. Juni 2012 in Almería (Spanien) konnte als Polynom vierten Grades  $I_0(t) = a \cdot t^4 + b \cdot t^3 + c \cdot t^2 + d \cdot t$  beschrieben werden (vgl. Kapitel 4.2.5). Damit ergibt sich die Auflösung des Integrals zu Gleichung 4.3.

$$I^*(t) = \frac{1}{L} \cdot \frac{a \cdot t^4 + b \cdot t^3 + c \cdot t^2 + d \cdot t}{\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)}} \cdot \left(1 - e^{-\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L}\right) \quad \text{Gleichung 4.3}$$

- $I^*$ : mittlere integrale Photonenflussdichte zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $a, b, c, d$ : Modellparameter des Polynomansatzes  
 $t$ : Zeit, s  
 $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $\text{L}^{0,5} \text{g}^{-0,5} \text{cm}^{-1}$   
 $c_x$ : Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $L$ : maximale Schichtdicke, cm



Bei der Anwendung von Tagesganglinien ist während der beleuchteten Phase Wachstum zu beobachten, während nachts ohne Licht kein Wachstum stattfindet oder sogar eine geringe Abnahme der Biomassekonzentration auftritt. Für das tagsüber stattfindende Wachstum lassen sich abhängig von der Schichtdicke bis zu einer Biotrockenmassekonzentration, ab der das Licht limitierend wirkt, exponentielle Wachstumsraten ermitteln. Für den Zeitraum, in dem exponentielles Wachstum auftritt, kann in einem zweiten Integrationschritt nach Gleichung 4.4 die mittlere integrale Photonendichte  $I^*$  über die Zeit integriert werden, um eine mittlere integrale Photonendichte für die Zeitspanne der exponentiellen Wachstumsphase zu ermitteln.

$$I^{**} = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \int_{t_a}^{t_e} I^*(t) dt \quad \text{Gleichung 4.4}$$

- $I^*$ : mittlere integrale Photonendichte zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $t_{a/e}$ : Anfang/Ende der exponentiellen Wachstumsphase, h  
 $\Delta t$ : Differenz zwischen Start- und Endzeitpunkt der exp. Wachstumsphase, h  
 $L$ : maximale Schichtdicke, cm

Da eine analytische Lösung des Integrals nicht möglich war, wurde es mit der Funktion *integral* in Matlab R2017a gelöst.

Die Ermittlung der Fehlerabweichung der mittleren integralen Photonendichte wurde mit der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung durchgeführt. Bei den fehlerbehafteten Größen handelt es sich um den Extinktionskoeffizienten sowie die Biotrockenmassekonzentration, die nach Gleichung 3.4 die Fehler von Wachstumsrate sowie Biomassekonzentration zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase einschließt. Die Fehlerrechnung setzt sich daher wie in Gleichung 4.5 gezeigt zusammen.

$$\Delta I^{**} = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial I^{**}}{\partial \varepsilon}\right)^2 \cdot \Delta \varepsilon^2 + \left(\frac{\partial I^{**}}{\partial c_{x,0}}\right)^2 \cdot \Delta c_{x,0}^2 + \left(\frac{\partial I^{**}}{\partial \mu}\right)^2 \cdot \Delta \mu^2\right)} \quad \text{Gleichung 4.5}$$

- $\Delta I^{**}$ : Fehler der mittleren integralen Photonendichte,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
 $\Delta \varepsilon$ : Fehler des Extinktionskoeffizienten  
 $\Delta c_{x,0}$ : Fehler der Biotrockenmassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$   
 $\Delta \mu$ : Fehler der Wachstumsrate,  $\text{d}^{-1}$

Mit der Umformung nach dem Satz von der majorisierten Konvergenz nach Lebesgue (Bronštejn & Semendjaev, 2006), der in Gleichung 4.6 gezeigt ist, können die partiellen Ableitungen zu Gleichungen 4.7-4.12 gelöst werden.

$$\frac{\partial I^{**}}{\partial i} = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \cdot \frac{d}{di} \int_{t_a}^{t_e} I(t, \varepsilon, \mu, c_{x,0}) dt = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \cdot \int_{t_a}^{t_e} \frac{d}{di} I(t, \varepsilon, \mu, c_{x,0}) dt \quad \text{Gleichung 4.6}$$

Damit ergibt sich für die partielle Ableitung von  $I^{**}$  nach  $\varepsilon$  Gleichung 4.7.

$$\frac{\partial I^{**}}{\partial \varepsilon} = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \cdot \int_{t_a}^{t_e} \left( \frac{I_0(t)}{\varepsilon^2 \cdot \sqrt{c_x(t)}} \cdot e^{-\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L} \cdot (\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L + 1) \right) dt \quad \text{Gleichung 4.7}$$

Die partielle Ableitung von  $I^{**}$  nach  $c_{x,0}$  kann mit Gleichung 4.8 dargestellt werden.

$$\frac{\partial I^{**}}{\partial c_{x,0}} = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \int_{t_a}^{t_e} \left( \frac{\partial I^{**}}{\partial c_x} \cdot \frac{\partial c_x}{\partial c_{x,0}} \right) dt \quad \text{Gleichung 4.8}$$

Hier gelten für die partiellen Ableitungen von  $I^{**}$  nach  $c_x$  sowie von  $c_x$  nach  $c_{x,0}$  Gleichung 4.9 und Gleichung 4.10.

$$\frac{\partial I^{**}}{\partial c_x} = \frac{I_0(t)}{2 \cdot c_x(t)^{\frac{3}{2}} \cdot \varepsilon} \cdot e^{-\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L} \cdot (\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L - e^{\varepsilon \cdot \sqrt{c_x(t)} \cdot L} + 1) \quad \text{Gleichung 4.9}$$

$$\frac{\partial c_x}{\partial c_{x,0}} = e^{\mu \cdot t} \quad \text{Gleichung 4.10}$$

Eine partielle Ableitung von  $I^{**}$  nach  $\mu$  kann mit Gleichung 4.11 beschrieben werden.

$$\frac{\partial I^{**}}{\partial \mu} = \frac{1}{L \cdot \Delta t} \int_{t_a}^{t_e} \frac{\partial I^{**}}{\partial c_x} \cdot \frac{\partial c_x}{\partial \mu} dt \quad \text{Gleichung 4.11}$$

Die Darstellung der partiellen Ableitung von  $I^{**}$  nach  $c_x$  erfolgt dabei ebenfalls nach Gleichung 4.9, die Ableitung von  $c_x$  nach  $\mu$  nach Gleichung 4.12.

$$\frac{\partial c_x}{\partial \mu} = c_{x,0} \cdot t \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Gleichung 4.12

Auch die Integrale der partiellen Ableitungen wurden numerisch in Matlab mit der Funktion *integral* gelöst. Im Anschluss ist ein Zusammenhang aus Wachstumsrate und mittlerer integraler Photonenflussdichte darstellbar.

#### 4.5 Analytische Methoden

Im Folgenden wird ein Überblick über die verschiedenen analytischen Methoden für die reaktionstechnische Charakterisierung mit *Dunaliella salina* sowie die Extraktion von Carotinoiden aus Algenbiomasse gegeben.

##### 4.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte photometrisch mit einem Einstrahl-Spektralphotometer (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 680 sowie 750 nm in Triplikaten. Das Messprinzip beruht auf dem in Gleichung 4.13 beschriebenen Lambert-Beer'schen Gesetz.

$$E_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot l$$

Gleichung 4.13

- $E_\lambda$ : Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ , -
- $I$ : Intensität des transmittierten Lichts,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichts,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- $c$ : Stoffkonzentration,  $\text{mol L}^{-1}$
- $\varepsilon_\lambda$ : Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
- $l$ : Schichtdicke, cm

Der Quotient aus Abschwächung der Lichtintensität durch eine absorbierende Suspension sowie Eingangsintensität kann demnach in Abhängigkeit der Schichtdicke mit der Konzentration an Partikeln in der Suspension korreliert werden. Der lineare Messbereich, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz gültig war, lag bei dem verwendeten Photometer und einer Schichtdicke von 1,0 cm zwischen 0,1 und 0,3. Sowohl die Verdünnung der Proben als auch die Nullmessung wurden mit dem im Satzprozess verwendeten Medium durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 750 nm, da bei dieser Wellenlänge die akzessorischen Pigmente von Mikroalgen keinen Einfluss auf die Messung nehmen (Griffiths *et al.*, 2011).

#### 4.5.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Die Biotrockenmassekonzentration wurde gravimetrisch mindestens einmal täglich aus 5 mL Zellsuspension ermittelt. Zunächst wurde das Zellpellet in einem konischen Zentrifugenröhrchen (15 mL) durch Zentrifugation (3260 *g*, 10 min, Rotixa 50 RS, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) vom Überstand getrennt. Durch Resuspendieren des Pellets in 200-400  $\mu\text{L}$  vollentsalztem Wasser wurden Salzreste gelöst. Im Anschluss konnte die Zellsuspension in ein getrocknetes 2 mL Reaktionsgefäß überführt werden. Der Überstand wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15000 *g*, 10 min, Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) verworfen, das Pellet wurde für mindestens 48 h bei 80 °C in einem Trockenschrank (UN 260, Memmert, Schwabach) getrocknet und nachfolgend gewogen. Die Biotrockenmassekonzentration ergab sich aus der Massendifferenz von gefülltem und leerem Eppendorfreaktionsgefäß sowie aus dem eingesetzten Volumen.

Aus den bestimmten Biomassekonzentrationen und der zum gleichen Zeitpunkt ermittelten optischen Dichte wurde mit Gleichung 4.14 ein Korrelationsfaktor zur Berechnung der Biotrockenmassekonzentration zu jedem Messwert ermittelt.

$$c_X = f_X \cdot OD_{750\text{ nm}} \quad \text{Gleichung 4.14}$$

$c_X$ : Biotrockenmassekonzentration,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

$f_X$ : Korrelationsfaktor,  $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$

$OD_{750\text{ nm}}$ : optische Dichte bei 750 nm, -

Der Korrelationsfaktor wurde für jeden Prozess gesondert bestimmt.

#### 4.5.3 Bestimmung der Salinität

Die Überprüfung des Salzgehalts erfolgte in Satzprozessen mit Salzsteigerung mit jeder Probenahme, bei konstant bleibendem Salzgehalt mindestens einmal täglich. Zur Bestimmung diente ein Refraktometer (HI 96822, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, Deutschland), dessen Messbereich zwischen 0 und 50  $\text{g L}^{-1}$  lag. Proben, deren Salinität über diesem Schwellenwert lag, wurden dementsprechend verdünnt.

Das Messprinzip eines Refraktometers beruht auf der Messung des Brechungsindex der Salzlösung anhand des Verhaltens von Licht am Übergang eines Prismas mit bekannten Eigenschaften und der Salzlösung. Als Referenz diente der Brechungsindex von vollentsalztem Wasser.

#### 4.5.4 Extraktion von Carotinoiden

Zur analytischen Extraktion von Carotinoiden aus Algenbiomasse wurden den Satzprozessen je nach Biotrockenmassekonzentration zwischen einem und vier Milliliter Zellsuspension entnommen und in 2 mL Safe-Lock Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (15000 *g*, 10 min, Mikro 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert. Für den ersten Extraktionsschritt wurden dem Zellpellet 750 mg Glaskügelchen sowie 1000 µL Chloroform hinzugefügt. Nach zehnmütigem Zellaufschluss in einer Schwingmühle (25 Hz, Retsch MM 200, Retsch GmbH, Haan) und Zentrifugation (15000 *g*, 10 min) wurde der Überstand in ein weiteres 2 mL Safe-Lock Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde im Anschluss vier bis siebenmal mit 500 µL Chloroform wiederholt, bis Überstand sowie Zellpellet farblos waren. Das Chloroform wurde über Nacht im Abzug ausgedampft, sodass das Extrakt in einem definierten Volumen Chloroform resuspendiert werden konnte.

Im Rahmen von einstufigen Extraktionen wurden zusätzlich Vorversuche zur Extraktionseffizienz verschiedener Lösemittel durchgeführt. Im Gegensatz zur Bestimmung des Absolutgehalts an  $\beta$ -Carotin wurden in einem einzigen Extraktionsschritt 0,5 mL Algensuspension mit 0,5 mL des jeweiligen Lösemittels mit und ohne Glaskügelchen verwendet. Das weitere Vorgehen entsprach dem der analytischen Extraktion.

#### 4.5.5 Bestimmung der Gesamtcarotinoidkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtcarotinoidkonzentration fand mit den in Kapitel 4.5.4 hergestellten Extrakten spektralphotometrisch statt. Dazu wurden diesen 1000 µL Chloroform hinzugefügt. Die entstandene Lösung wurde um den Faktor 10 verdünnt und in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas überführt. Im Anschluss wurde die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen in einem Spektralphotometer (Biomate 3, Thermo Spectronic, Madison, USA) bestimmt. Die Berechnung des Gesamtcarotinoidgehalts erfolgte mit den Gleichungen nach Wellburn (1994).

$$c_a = 10,91 \cdot A_{666 \text{ nm}} - 1,2 \cdot A_{648 \text{ nm}} \quad \text{Gleichung 4.15}$$

$$c_b = 16,38 \cdot A_{648 \text{ nm}} - 1,2 \cdot A_{666 \text{ nm}} \quad \text{Gleichung 4.16}$$

$$c_{tot} = \frac{1000 \cdot A_{480 \text{ nm}} - 1,42 \cdot c_a - 46,09 \cdot c_b}{202} \quad \text{Gleichung 4.17}$$

$c_a$ : Konzentration an Chlorophyll *a*, mg L<sup>-1</sup>

$c_b$ : Konzentration an Chlorophyll *b*, mg L<sup>-1</sup>

$A_\lambda$ : Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda$ , -

$c_{tot}$ : Gesamtcarotinoidkonzentration, mg L<sup>-1</sup>

Die Gleichungen wurden empirisch aufgenommen und berücksichtigen zusätzlich zur Carotinoidabsorption bei 480 nm auch den Anteil der Absorption der Chlorophylle *a* und *b* bei 480 nm. Dieser wird in Gleichung 4.17 abgezogen.

#### 4.5.6 Spektralphotometrischer Nachweis von $\beta$ -Carotin

Zusätzlich zur Bestimmung der Gesamtcarotinoidkonzentration (vgl. Kapitel 4.5.5) wurde in der Literatur der spektralphotometrische Nachweis von  $\beta$ -Carotin anhand einer Wellenlänge beschrieben (Hejazi *et al.*, 2002; Hejazi & Wijffels, 2003; Morowvat & Ghasemi, 2016; Shaker *et al.*, 2017; Zhu & Jiang, 2008). Die Korrelation wurde mit  $\beta$ -Carotin-Standards zwischen 2,5 und 10 mg L<sup>-1</sup> in Chloroform bei dem ermittelten Absorptionsmaximum von 465 nm bestimmt und ergab sich zu Gleichung 4.18.

$$c_{Car,465\text{ nm}} = 4,26 \cdot A_{465\text{ nm}} \quad \text{Gleichung 4.18}$$

$c_{Car,465\text{ nm}}$ : Carotinoidkonzentration, g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup>

$A_{465\text{ nm}}$ : Absorption bei 465 nm, -

Im Vergleich zu den Gleichungen nach Wellburn (1994) berücksichtigt diese Messmethode keine Absorption von Chlorophyll oder weiteren Pigmenten. Zusätzlich wird diese Methode zur expliziten Bestimmung von  $\beta$ -Carotin verwendet, obwohl auch weitere Carotinoide in demselben Wellenlängenbereich absorbieren. Diese Methode wurde somit zur Einordnung der Messdaten in die Literatur und zum Vergleich mit weiteren Analytikmethoden durchgeführt.

#### 4.5.7 Quantitativer Nachweis von Lutein und $\beta$ -Carotin

Zur Quantifizierung von  $\beta$ -Carotin und Lutein wurden die Extrakte aus Kapitel 4.5.4 in 200  $\mu$ L Chloroform gelöst und in Autosampler-Fläschchen mit Spitzeneinsatz überführt. Die Trennung der Substanzen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in einer Anlage von Thermo Scientific mit einer auf 35 °C temperierten Trennsäule des Typs Develosil 5  $\mu$ m RP-Aqueous C30 Säule (Phenomenex LTD, Aschaffenburg). Die Komponenten der Anlage sind in Tabelle A.5 genauer spezifiziert. Als Laufmittel wurde eine Acetonitril-Chloroform-Mischung verwendet, deren genaue Zusammensetzung in Tabelle 4.2 zusammengefasst ist.

**Tabelle 4.2:** Zusammensetzung der Laufmittelmischung während der Carotinoidtrennung. <sup>a)</sup>lineare Zunahme, <sup>b)</sup>lineare Abnahme.

| Stufe | Laufzeit, min | Acetonitril, % (v/v) | Chloroform, % (v/v) |
|-------|---------------|----------------------|---------------------|
| 0     | 0,0–2,5       | 83                   | 17                  |
| 1     | 2,5–6,0       | 75                   | 25                  |
| 2     | 6,0–12,5      | 60                   | 40                  |
| 3     | 12,5–14,0     | 60–83 <sup>a)</sup>  | 40–17 <sup>b)</sup> |

Es wurden 20 µL der Probe bei einer Flussrate von 1,2 mL min<sup>-1</sup> injiziert. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor bei 450 nm. Die Bestimmung der Carotinoidkonzentrationen erfolgte über Kalibriergeraden mit Standards.

## 5 Charakterisierung von *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren<sup>1</sup>

### 5.1 Auswahl eines *Dunaliella*-Stammes zur Produktion von $\beta$ -Carotin

Zur Auswahl eines geeigneten *D. salina*-Stammes für Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion wurden drei Stämme der Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG) sowie ein Stamm der *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP, Schottland) ausgewählt. Diese Stämme wurden in Satzprozessen unter Tagesganglinien von Licht und Temperatur des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien) bei pH 8,5 in Flachplatten-Photobioreaktoren verglichen. Die Satzprozesse wurden sowohl bei einer konstanten Salinität ( $35 \text{ g L}^{-1}$ ) als auch bei steigender Salzkonzentration ( $35\text{-}280 \text{ g L}^{-1}$ ) durchgeführt. Wachstumskurven und Verläufe von  $\beta$ -Carotin-Konzentration und -Gehalt der vier ausgewählten Stämme bei konstantem Salzgehalt sind in Abbildung 5.1 zusammengefasst.

Im Satzprozess mit *D. salina* SAG184.80 wies der Verlauf der Salinität leichte Abweichungen zum Sollwert von  $35 \text{ g L}^{-1}$  NaCl auf. Statt der konstanten, vorgegeben Salinität wurde aufgrund von nicht ausreichend ausgeglichener Verdunstung eine leichte Erhöhung der Salinität bis  $50 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet. Die Wachstumskurve zeigte den typischen Verlauf photoautotroph wachsender Mikroorganismen. Bei Lichteinstrahlung, die den Tagesverlauf des Lichts widerspiegelt, wuchsen die Mikroalgen, während nachts kein Wachstum oder geringes Absterben der Zellen festgestellt wurde. Über die Gesamtzeit betrachtet, ging die kurze Verzögerungsphase in exponentielles Wachstum über. Anschließend wiesen die Zellen lineares Wachstum auf, welches nach 12 d in der stationären Phase endete. Während der gesamten Prozesszeit stiegen sowohl die  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Zellsuspension als auch der  $\beta$ -Carotin-Gehalt der Zellen an.

Die Salinität im Satzprozess mit *D. salina* SAG42.88 blieb wie vorgegeben konstant bei  $35 \text{ g L}^{-1}$  NaCl. Die Wachstumskurve dieses Stammes wies ebenfalls die typischen Wachstumsphasen auf. Die Verzögerungsphase zu Beginn des Satzprozesses war mit 1,8 d etwas länger. Darüber hinaus konnte das lineare Wachstum bis zu einer Prozesszeit von 18,7 d beobachtet werden. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration stieg während der Verzögerungsphase kaum an. Der anschließende Anstieg der Konzentration stoppte nach einer Prozesszeit von 7,8 d, woraufhin sie zunächst konstant blieb und schließlich abnahm. Im Verlauf des  $\beta$ -Carotin-Gehalts spiegelte sich dieses Verhalten in einer Zunahme bis 7,8 d und einer anschließenden Abnahme wider.

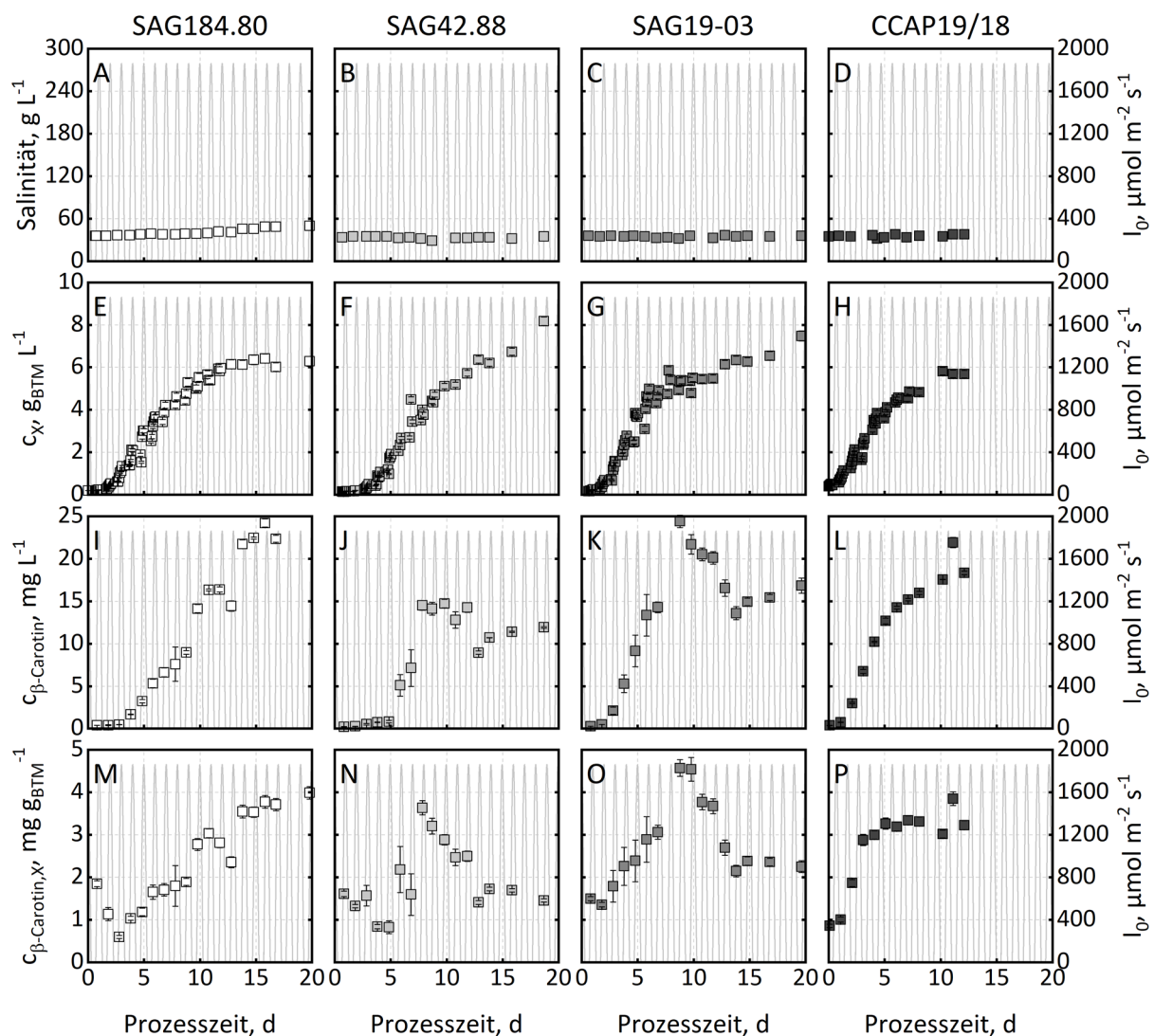
---

<sup>1</sup> Teile der Ergebnisse wurden bereits publiziert in:

Wolf L, Cummings T, Müller K, Reppke M, Volkmar M, Weuster-Botz D. 2020. Production of  $\beta$ -carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Eng Life Sci* DOI: 10.1002/elsc.202000044



Im Satzprozess mit *D. salina* SAG19-03 betrug die Salinität über die Prozesszeit unverändert wie vorgegeben  $35 \text{ g L}^{-1}$ . Die Verzögerungsphase war mit  $< 1 \text{ d}$  sehr kurz und mündete in exponentielles Wachstum. Die anschließende lineare Wachstumsphase dauerte bis 7,8 d, woraufhin ein weiteres Abflachen der Wachstumskurve beobachtet werden konnte. Bis zum Ende der beschriebenen linearen Wachstumskurve stieg die  $\beta$ -Carotin-Konzentration stark an. Nach Erreichen des Maximums nach 8,8 d sank sie, bis sie sich zwischen 14,8-19,7 d stabilisierte. Auch der  $\beta$ -Carotin-Gehalt stieg bis zu einer Prozesszeit von 8,8 d deutlich an, nahm jedoch im Anschluss wie die Konzentration ab.

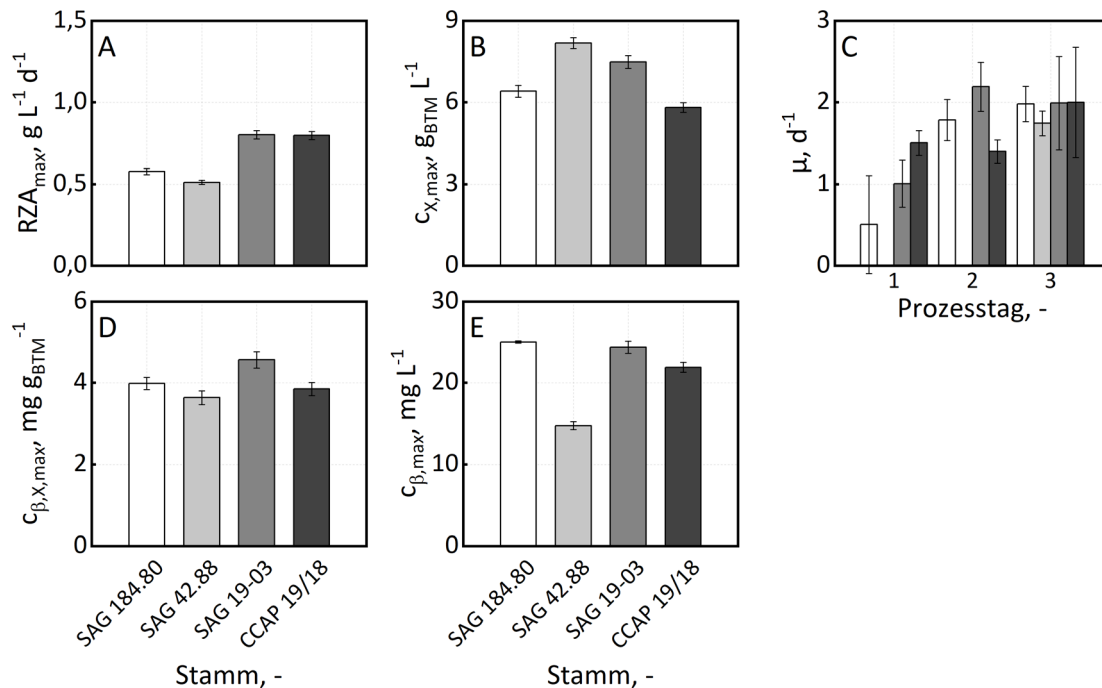


**Abbildung 5.1:** Verlauf von Salinität (A-D), Biotrockenmassekonzentration (E-H),  $\beta$ -Carotin-Konzentration (I-L) und  $\beta$ -Carotin-Gehalt (M-P) verschiedener *D. salina*-Stämme in Flachplatten-Photobioreaktoren bei Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15.06.2012, Almería, Spanien), pH 8,5, „BG11 Biomass“-Medium und einer konstanten Salinität von  $35 \text{ g L}^{-1}$  NaCl. Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *D. salina* SAG184.80 (weiß), *D. salina* SAG42.88 (hellgrau), *D. salina* SAG19-03 (grau) und *D. salina* CCAP19/18 (dunkelgrau).

Bei dem letzten untersuchten Stamm handelte es sich um *D. salina* CCAP19/18. Während der Prozesszeit dieses Satzprozesses wies die Salinität stets die vorgegebenen  $35 \text{ g L}^{-1}$  NaCl auf. Die Verzögerungsphase entfiel in diesem Satzprozess fast vollständig. Das exponentielle Wachstum ging

nach 3,2 d in lineares Wachstum über. Die stationäre Phase wurde nach einer Prozesszeit von 10,2 d erreicht. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration stieg über den gesamten Prozess an. Der  $\beta$ -Carotin-Gehalt erreichte jedoch nach 5,1 d ein Plateau und variierte im Anschluss nur leicht.

Die maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten, die maximalen Biotrockenmassekonzentrationen, die Wachstumsraten der ersten drei Tage sowie maximale  $\beta$ -Carotin-Gehalte und -Konzentrationen sind in Abbildung 5.2 zusammengefasst.

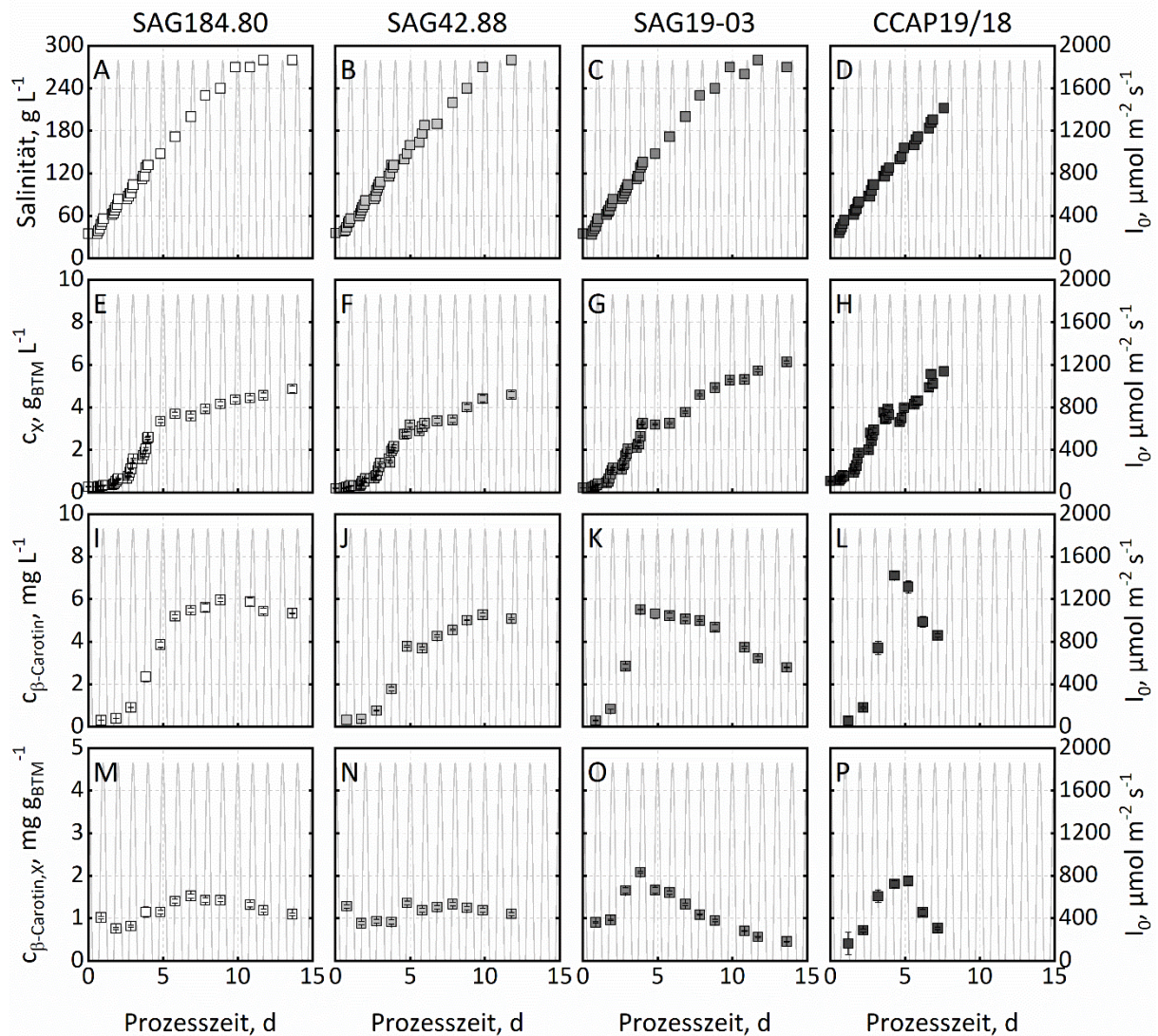


**Abbildung 5.2:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozesstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5 mit „BG11 Biomass“-Medium bei Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15.06.2012, Almería, Spanien) und konstanter Salinität von  $35\ g\ L^{-1}$ . Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *D. salina* SAG184.80 (weiß), *D. salina* SAG42.88 (hellgrau), *D. salina* SAG19-03 (grau) und *D. salina* CCAP19/18 (dunkelgrau). Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Die maximalen Raum-Zeit-Ausbeuten bei einer konstant bleibenden Salinität von  $35\ g\ L^{-1}$  wurden mit *D. salina* CCAP19/18 ( $0,80 \pm 0,03\ g_{BTM}\ L^{-1}\ d^{-1}$ ) und *D. salina* SAG19-03 ( $0,80 \pm 0,02\ g_{BTM}\ L^{-1}\ d^{-1}$ ) erzielt. Die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration lag mit  $8,2 \pm 0,2\ g_{BTM}\ L^{-1}$  für *D. salina* SAG42.88 deutlich über der mit *D. salina* CCAP19/18 erreichten Biotrockenmassekonzentration von  $5,8 \pm 0,2\ g_{BTM}\ L^{-1}$ . Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *D. salina* SAG184.80 und SAG42.88 längere Verzögerungsphasen aufweisen, da eine Ermittlung der exponentiellen Wachstumsraten am ersten Prozesstag nicht möglich war. Das schnellste Wachstum am ersten Tag wurde mit *D. salina* CCAP19/18 erreicht. Die maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Gehalte der verschiedenen Stämme lagen zwischen  $3,6$ - $4,6\ mg\ g_{BTM}^{-1}$ , wobei der höchste Wert im Satzprozess mit *D. salina* SAG19-03 ermittelt

wurde. Die maximalen  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen betragen 22-25  $\text{mg L}^{-1}$  und wurden nur im Satzprozess mit *D. salina* SAG42.88 mit 15  $\text{mg L}^{-1}$  deutlich unterschritten.

Da eine hohe Salinität dafür bekannt ist, die  $\beta$ -Carotin-Produktion mit *D. salina* zu steigern, wurden zusätzlich Satzprozesse bei steigender Salinität durchgeführt. Deren Wachstumskurven sowie Verläufe von Salinität,  $\beta$ -Carotin-Konzentration und -Gehalt sind in Abbildung 5.3 dargestellt.



**Abbildung 5.3:** Verlauf von Salinität (A-D), Biotrockenmassekonzentration (E-H),  $\beta$ -Carotin-Konzentration (I-L) und  $\beta$ -Carotin-Gehalt (M-P) verschiedener *D. salina*-Stämme in Flachplatten-Photobioreaktoren bei Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15.06.2012, Almería, Spanien), pH 8,5, „BG11 Biomasse“-Medium und einer Steigerung der Salinität bis über 200  $\text{g L}^{-1}$  NaCl. Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *D. salina* SAG184.80 (weiß), *D. salina* SAG42.88 (hellgrau), *D. salina* SAG19-03 (grau) und *D. salina* CCAP19/18 (dunkelgrau).

Der vorgegebene Verlauf der Salinität wurde mindestens einmal täglich überprüft. Die Salzsteigerung war somit in allen Satzprozessen gleich. *D. salina* SAG184.80 wies eine kurze Verzögerungsphase auf, an die eine exponentielle Wachstumsphase bis zu einer Prozesszeit von 4 d anschloss. Daraufhin konnte ein Abflachen der Wachstumskurve bis zur stationären Phase beobachtet werden, in der die

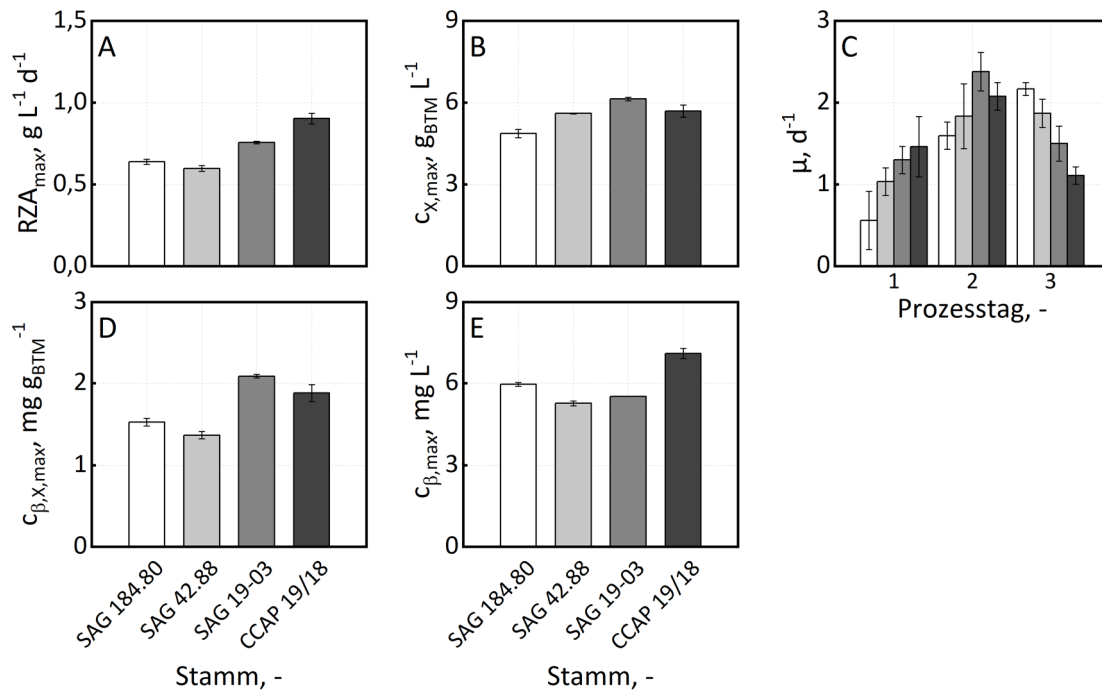
maximale Biotrockenmassekonzentration erreicht wurde. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Zellsuspension zeigte einen ähnlichen Verlauf. Bis zu einer Prozesszeit von 5 d konnte eine starke Zunahme der  $\beta$ -Carotin-Konzentration beobachtet werden. Im Anschluss blieb sie relativ konstant bei etwa  $6 \text{ mg L}^{-1}$ . Die daraus ermittelten  $\beta$ -Carotin-Gehalte stiegen zu Beginn leicht von  $1,0 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf  $1,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  an. Im Anschluss sank der intrazelluläre Gehalt wieder leicht. Das Abflachen der Wachstumskurve sowie der  $\beta$ -Carotin-Konzentration wurde etwa bei einer Salzkonzentration von  $170 \text{ g L}^{-1}$  beobachtet. Der maximale  $\beta$ -Carotin-Gehalt wurde bei einer Salinität von  $200 \text{ g L}^{-1}$  ermittelt, lag jedoch nur wenig höher als zu Beginn des Satzprozesses.

Die Verläufe von Biotrockenmasse- und  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Satzprozess mit *D. salina* SAG42.88 unterscheiden sich nur leicht von *D. salina* SAG184.80. Auch hier wurde nach der anfänglichen Verzögerungsphase exponentielles Wachstum bis zu einer Prozesszeit von 4 d beobachtet. Das Abflachen der Wachstumskurve fand dementsprechend schon bei einer Salinität von  $120 \text{ g L}^{-1}$  statt. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration stieg bis zu einer Prozesszeit von 10 d an und blieb im Anschluss konstant. Über die gesamte Prozesszeit konnte keine Tendenz des  $\beta$ -Carotin-Gehalts beobachtet werden. Dieser schwankte zwischen  $0,9\text{-}1,4 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

Auch im Satzprozess mit *D. salina* SAG19-03 mündete die kurze Verzögerungsphase in exponentielles Wachstum. Dieses dauerte bis zu einer Prozesszeit von 4 d an und ging anschließend in lineares Wachstum über. Der Übergang zum linearen Wachstum fand bei einer Salinität von  $130 \text{ g L}^{-1}$  statt. Im Gegensatz zu *D. salina* SAG184.80 und SAG42.88 wurde länger Wachstum beobachtet. Im Gegensatz zum Wachstum fand der Anstieg der  $\beta$ -Carotin-Konzentration nur bis zu einer Prozesszeit von 3,8 d statt. Ab der korrespondierenden Salinität von  $125 \text{ g L}^{-1}$  wurde ein Abfallen der Konzentration beobachtet. Der  $\beta$ -Carotin-Gehalt der Zellen verdoppelte sich zu Beginn und erreichte sein Maximum ebenfalls bei  $125 \text{ g L}^{-1}$  NaCl. Daraufhin sank der Gehalt stark ab.

Im Satzprozess mit *D. salina* CCAP19/18 war die Verzögerungsphase kürzer als bei den anderen Stämmen. Die exponentielle Wachstumsphase ging nach 3,8 d in lineares Wachstum über. Auch die  $\beta$ -Carotin-Konzentration stieg bis zu einer Prozesszeit von 4,2 d stark an. Ab diesem Zeitpunkt und der damit verbundenen Überschreitung der Salinität von  $120 \text{ g L}^{-1}$  NaCl wurde eine Abnahme der  $\beta$ -Carotin-Konzentration beobachtet. Auch das Maximum des  $\beta$ -Carotin-Gehalts in den Algenzellen wurde zwischen 4,2-5,2 d beobachtet.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Prozesse wurden die maximale Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse, die maximal erreichte Biotrockenmassekonzentration, die Wachstumsraten der ersten drei Prozesstage sowie  $\beta$ -Carotin-Konzentration und -Gehalt in Abbildung 5.4 verglichen.



**Abbildung 5.4:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozesstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5 mit „BG11 Biomass“-Medium bei Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15.06.2012, Almería, Spanien). Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *D. salina* SAG184.80 (weiß), *D. salina* SAG42.88 (hellgrau), *D. salina* SAG19-03 (grau) und *D. salina* CCAP19/18 (dunkelgrau). Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Die für die *D. salina*-Stämme ermittelten Raum-Zeit-Ausbeuten lagen zwischen  $0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  mit *D. salina* SAG42.88 und  $0,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für *D. salina* CCAP19/18. Die höchste maximale Biotrockenmassekonzentration wurde mit  $6,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *D. salina* SAG19-03 erreicht, gefolgt von  $5,7 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *D. salina* CCAP19/18 und  $5,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  für *D. salina* SAG42.88. *D. salina* CCAP19/18 wies tendenziell die höchste Wachstumsrate am ersten Prozesstag auf, was auf die schnellste Adaption an die Bedingungen im Flachplatten-Photobioreaktor hindeuten kann. Die maximale  $\beta$ -Carotin-Konzentration lag bei  $7,1 \text{ mg L}^{-1}$  und wurde mit dem Stamm *D. salina* CCAP19/18 erreicht. Der höchste  $\beta$ -Carotin-Gehalt wurde im Satzprozess mit *D. salina* SAG19-03 ermittelt und lag mit  $2,1 \pm 0,02 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  nur leicht höher als die mit *D. salina* CCAP19/18 erreichten  $1,9 \pm 0,1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

## Diskussion

In den Satzprozessen zur Auswahl eines geeigneten *D. salina*-Stammes konnte gezeigt werden, dass unter den verwendeten Bedingungen Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Bildung stattfanden. Bei dem Stamm mit der kürzesten Verzögerungsphase handelte es sich um *D. salina* CCAP19/18. Dieser Stamm wies zum einen tendenziell die höchste Wachstumsrate an Tag 1 auf und erreichte sowohl bei konstanter Salinität als auch bei Salzsteigerung die höchste Raum-Zeit-Ausbeute bezogen auf die

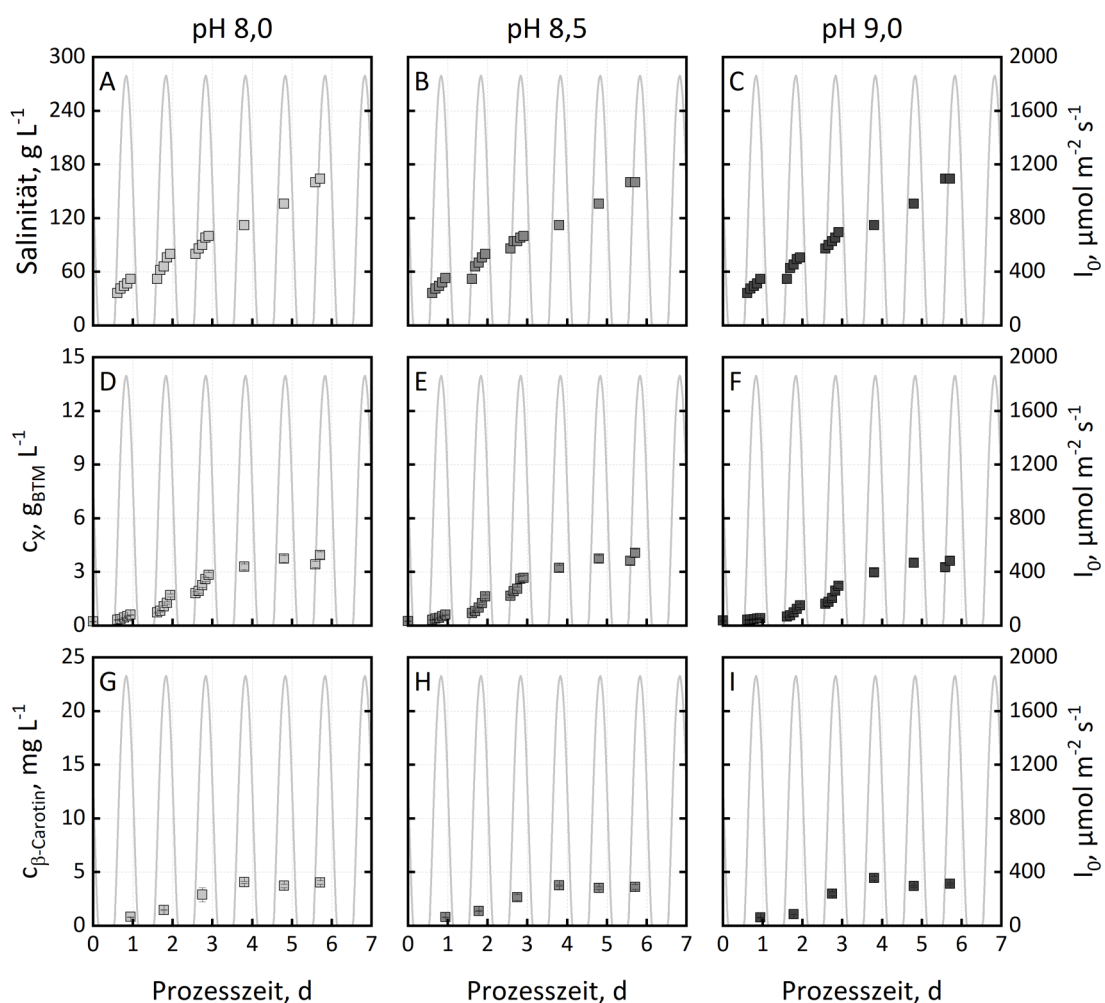


Biotrockenmasse. Auch die erreichte Biotrockenmassekonzentration lag bei Salzsteigerung nur wenig unter der von *D. salina* SAG19-03. Neben den ermittelten wachstumsbezogenen Zustandsgrößen erreichte *D. salina* CCAP19/18 im Satzprozess bei Salzsteigerung außerdem die höchste  $\beta$ -Carotinkonzentration in der Zellsuspension und lag mit dem  $\beta$ -Carotin-Gehalt nur leicht hinter *D. salina* SAG19-03 zurück. Darüber hinaus wurde mit *D. salina* CCAP19/18 bei steigender Salinität die höchste Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts verglichen mit Prozessbeginn beobachtet. Entgegen den Angaben in der Literatur (Borowitzka & Borowitzka, 1990; Loeblich, 1982) führte eine Steigerung der Salinität bei den verwendeten *D. salina*-Stämmen jedoch nicht zu einer Erhöhung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts. Die mit *D. salina* maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Gehalte von bis zu 10 % (Ben-Amotz & Avron, 1983; Borowitzka & Borowitzka, 1990; Prieto *et al.*, 2011) wurden mit keinem der untersuchten Stämme erreicht. Die erreichten  $\beta$ -Carotinkonzentrationen zwischen 6-25 mg L<sup>-1</sup> lagen hingegen im Bereich, der mit dem Stamm *D. salina* CCAP19/18 in Schüttelkolben und Roux-Flaschen erreicht wurde (Fazeli *et al.*, 2006; Mojaat *et al.*, 2008).

Aufgrund der trotzdem besten Ausgangsbedingungen bei steigendem Salzgehalt wurde somit eine Verbesserung der  $\beta$ -Carotin-Bildung des Stammes *D. salina* CCAP19/18 durch die Variierung verschiedener Prozessvariablen angestrebt. Der pH beeinflusst die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> für Mikroalgen. Da CO<sub>2</sub> zusammen mit Licht das wichtigste Substrat für die Photosynthese ist, kommt der Auswahl eines geeigneten pH und der damit verbundenen Bereitstellung von CO<sub>2</sub> eine entscheidende Rolle zu. Da der Salzgehalt zusätzlich das Bicarbonat-Puffersystem beeinflusst, ist es wichtig, einen pH zu identifizieren, der über die gesamte Prozesszeit sowie die korrespondierenden Salinitäten für Wachstum und Produktbildung geeignet ist. Da zudem Kontaminationen bei erhöhtem pH vermieden werden können, ist ein hoher pH von Vorteil. Der Einfluss der Temperatur ist ebenfalls eine wichtige Stellgröße für verschiedene Stoffwechselwege, die Wachstum und Produktbildung in Mikroalgen beeinflussen können. Gerade bei Tagesganglinien variiert die Temperatur stark zwischen Tag und Nacht. Auch über das ganze Jahr hinweg treten in offenen Photobioreaktoren jahreszeitenbedingt starke Temperaturschwankungen auf. Daher wurde überprüft, ob eine Erhöhung der Temperatur Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion von *D. salina* CCAP19/18 beeinflusst. Ein weiterer bekannter Faktor, der Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion mit *D. salina* beeinflusst, ist der Salzgehalt im Medium. Durch Verdunstung in offenen Photobioreaktoren steigt die Salinität über die Prozesszeit gesehen stetig an. Daher ist es notwendig einen geeigneten Toleranzbereich für den Mikroalgenstamm *D. salina* CCAP19/18 zu identifizieren. Da Nährstoffkonzentrationen einen großen Einfluss auf Wachstum und Metabolismus von Mikroalgen darstellen, ist es außerdem notwendig, eine geeignete Nährstoffzusammensetzung im Medium zu identifizieren.

## 5.2 Satzprozesse bei unterschiedlichem pH

Zur Ermittlung eines geeigneten pH für Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion wurden Satzprozesse bei Tagesganglinien des Lichts und der Temperatur (15. Juni 2012, Almería, Spanien) in Flachplatten-Photobioreaktoren durchgeführt. Der Verlauf von Photonenflussdichte und Temperatur entspricht den in Abbildung 4.4 vorgestellten Klimadaten des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien). Darüber hinaus wurde die Salinität über die Prozesszeit von 35 auf 160 g L<sup>-1</sup> gesteigert, um die Salzerhöhung in offenen Flachgerinnereaktoren durch einen Verdunstungsausgleich mit Meerwasser nachzustellen (vgl. Kapitel 4.2.5). Die Wachstumskurven sowie die zugehörigen Salinitäts- und  $\beta$ -Carotin-Bestimmungen sind in Abbildung 5.5 zusammengefasst.

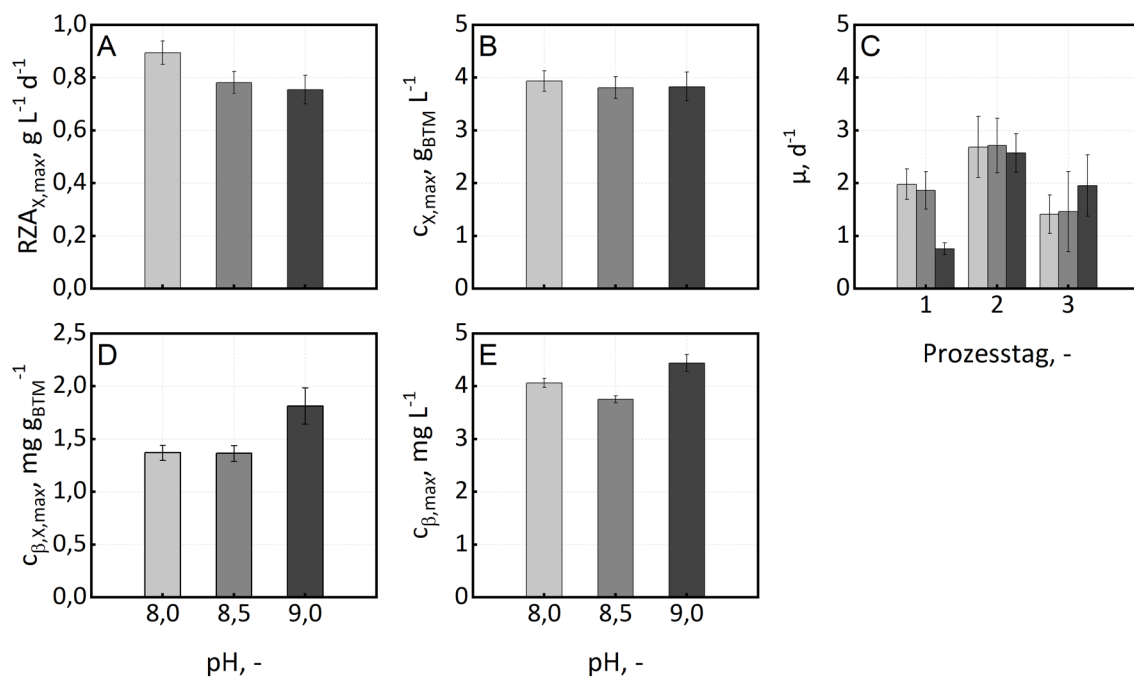


**Abbildung 5.5:** Darstellung der Salinität (A, B, C), der Biotrockenmassenkonzentrationen (D, E, F) und der  $\beta$ -Carotin-Konzentration (G, H, I) bei Satzprozessen mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren mit „BG11+“-Medium bei pH 8,0 (hellgrau), pH 8,5 (grau) und pH 9,0 (dunkelgrau). Die Temperatur (15-30 °C) und die Eingangsphotonenflussdichte  $I_0$  (0-1850  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) des 15. Juni 2012 (Almería Spanien) wurden täglich wiederholt.

Der angestrebte lineare Verlauf der Salzerhöhung über die Prozesszeit ist bei den Satzprozessen mit unterschiedlichem pH gut in Abbildung 5.5A-C zu erkennen. Die Salinität nach einer Prozesszeit von

5,6 Tagen entsprach  $160 \text{ g L}^{-1}$ . Der in Abbildung 5.5D-F abgebildete Verlauf der Wachstumskurven bildete während der beleuchteten Tagesphasen Wachstum ab, während in den Nachtphasen ohne Bestrahlung kein Wachstum oder eine leichte Abnahme der Biotrockenmassekonzentration beobachtet werden konnte. Trotz der Dynamik der Eingangsphotonenflussdichte konnte eine Einteilung in typische Wachstumsphasen stattfinden. Zunächst war unabhängig vom pH eine kurze Adaptionsphase erkennbar. Diese mündete bei Prozesszeiten zwischen 0,6-3 d in exponentielles Wachstum bis nach 4,8 d die stationäre Phase erreicht wurde. Die Verläufe der  $\beta$ -Carotin-Konzentration (Abbildung 5.5G-I) waren vergleichbar. Das Maximum der  $\beta$ -Carotin-Konzentration wurde bereits nach vier Tagen erreicht.

Eine Zusammenfassung relevanter Zustandsgrößen zur Beurteilung von Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Bildung ist in Abbildung 5.6 gezeigt.



**Abbildung 5.6:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozessstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,0 (hellgrau), 8,5 (grau) und 9,0 (dunkelgrau) mit „BG11+“-Medium bei Temperatur- und Lichtverläufen des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien). Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Die in Abbildung 5.6B gezeigten, maximal erreichten Biotrockenmassekonzentrationen nach 6 Tagen lagen zwischen  $3,6$ - $4,1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$ . Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute der Biotrockenmassebildung ist in Abbildung 5.6A zusammengefasst und lag mit  $0,89 \pm 0,04 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$  bei pH 8,0 am höchsten. Mit steigendem pH schien es eine leichte Tendenz zur Abnahme der Raum-Zeit-Ausbeute zu geben. Bei pH 9,0 lag sie nur noch bei  $0,75 \pm 0,05 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Gestützt wurde diese Beobachtung zusätzlich von der



deutlich niedrigeren Wachstumsrate von  $0,76 \text{ d}^{-1}$  am ersten Prozesstag bei pH 9,0 verglichen mit den erreichten Wachstumsraten von 1,98 bzw.  $1,86 \text{ d}^{-1}$  bei pH 8,0 bzw. pH 8,5. An den folgenden Prozess- tagen lagen nahezu identische Wachstumsrate bei den Satzprozessen mit unterschiedlichem pH vor.

Die höchsten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen wurden bereits nach einer Prozesszeit von vier Tagen bestimmt und erreichten 3,8-4,4  $\text{mg L}^{-1}$  (vgl. Abbildung 5.6E). Der maximal erreichte  $\beta$ -Carotin-Gehalt in *D. salina* CCAP19/18 lag mit  $1,8 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bei pH 9,0 leicht höher als bei pH 8,0 und pH 8,5.

## Diskussion

Mit der Durchführung von Satzprozessen bei Licht- und Temperaturverläufen eines Sommertags in Südspanien und steigendem Salzgehalt war es möglich, das pH-Intervall zwischen 8,0 und 9,0 als geeignet für Biomassebildung mit *D. salina* CCAP19/18 zu identifizieren. Die an Prozesstag 1 deutlich geringere Wachstumsrate im Satzprozess bei pH 9,0 deutet auf eine längere Verzögerungsphase von *D. salina* CCAP19/18 bei diesem erhöhten pH hin. Auch die  $\beta$ -Carotin-Herstellung blieb ohne starke Veränderungen durch den pH.

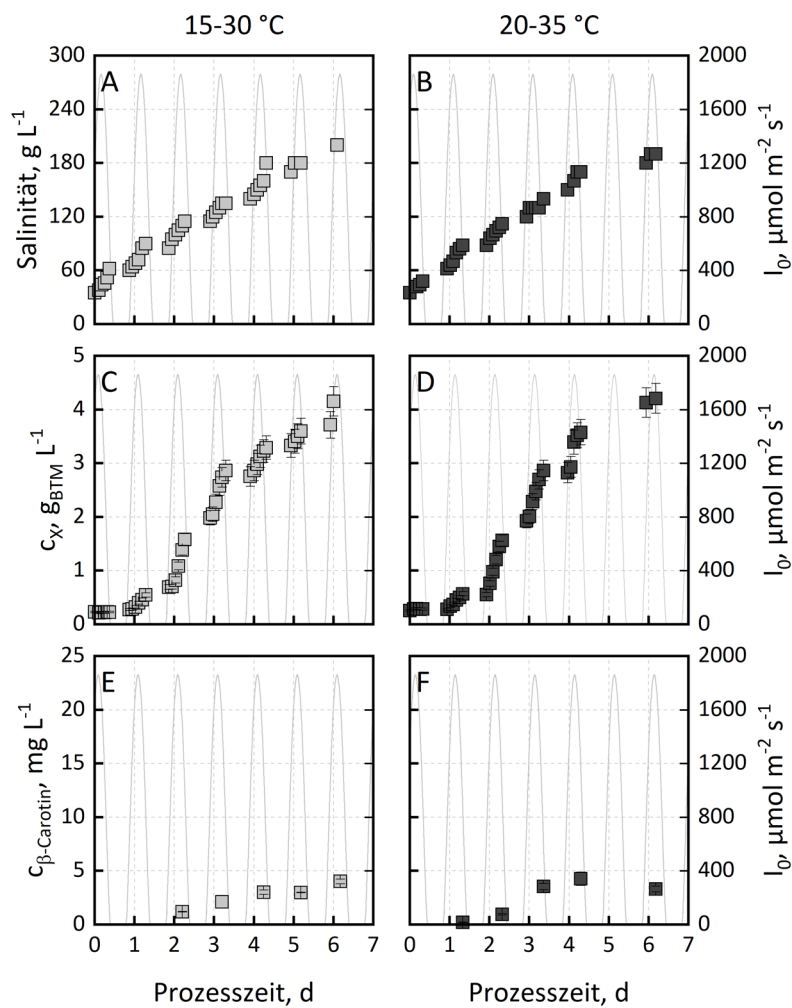
Der untersuchte pH-Bereich liegt somit innerhalb des für Mikroalgen geeigneten Bereichs zwischen pH 7 und pH 9 (Coleman & Colman, 1981). Wachstum von *D. salina* CCAP19/18 wurde bereits zwischen pH 7,5 und pH 8,0 gezeigt (Mojaat *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2014). Andere *D. salina* Stämme wiesen Wachstum zwischen pH 7-9,18 auf (Abu-Rezq *et al.*, 2010; Roopnarain *et al.*, 2014; Ying, 2014). Damit konnte gezeigt werden, dass *D. salina* CCAP19/18 ebenfalls einen pH am oberen Ende des üblichen Bereichs tolerieren kann. Zudem wurde gezeigt, dass der pH in einem weiten Salzbereich zwischen 35-160  $\text{g L}^{-1}$  angewendet werden kann. Für weitere Untersuchungen wurde aufgrund der bei pH 9,0 auftretenden längeren Verzögerungsphase pH 8,5 als Sollwert vorgegeben.

### 5.3 Satzprozesse bei unterschiedlichen Temperaturprofilen

Die Satzprozesse wurden bei unterschiedlichen Temperaturprofilen in Flachplatten-Photo- bioreaktoren mit „BG11+“-Medium bei pH 8,5 durchgeführt. Der Verlauf der Photonenflussdichte lag zwischen  $0-1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und entsprach realistischen Klimadaten des 15. Juni 2012 aus Almería (Spanien). Das korrespondierende Temperaturprofil lag zwischen 15-30 °C und wurde mit einem um 5 °C erhöhten Profil von 20-35 °C und ansonsten unveränderten Tag-Nacht-Verläufen verglichen, da im Mittelmeerraum auch höhere Temperaturen auftreten können. Die Salinität wurde von 35 bis 200  $\text{g L}^{-1}$  gesteigert.

Die Verläufe von Salinität, Biotrockenmassekonzentration und  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Zellsuspension sind in Abbildung 5.7 zusammengefasst.

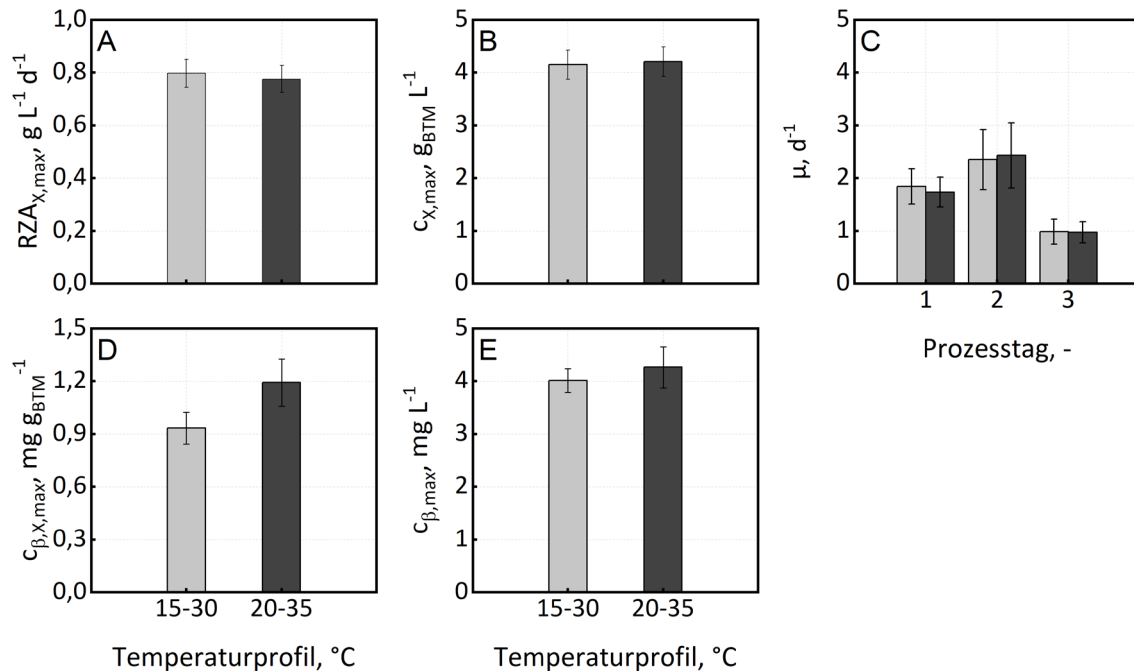
Die Salinität stieg bei beiden Temperaturprofilen wie vorgegeben linear an und erreichte nach 6,1 d  $200 \text{ g L}^{-1}$ . Wie auch bei den Satzversuchen zur Bestimmung eines geeigneten pH wurden charakteristische Wachstumskurven beobachtet. Die Verzögerungsphase direkt nach Inokulation mündete in exponentielles Wachstum. Im Anschluss flachte die Wachstumskurve bis zur stationären Phase am Ende der Satzprozesse weiter ab. Genauso wie in vorherigen Versuchen beobachtet werden konnte, wurde auch hier die maximale  $\beta$ -Carotin-Konzentration zwischen Tag 4 und 6 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Salinität von  $120 \text{ g L}^{-1}$  überschritten.



**Abbildung 5.7:** Darstellung der Salinität (A, B), der Biotrockenmassekonzentrationen (C, D) und der  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E, F) bei Satzprozessen mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren mit „BG11+“-Medium bei pH 8,5. Das täglich wiederholte Temperaturprofil von Almería, Spanien (15-30 °C, hellgrau) wurde um 5 °C auf 20-35 °C (dunkelgrau) erhöht ohne die Tagesganglinie und die Eingangsphotonenflussdichte  $I_0$  (0-1850  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zu verändern.

Zum Vergleich sind die maximal erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten, Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen sowie Wachstumsraten in Abbildung 5.8 zusammengefasst.

Nach sechs Tagen wurden Biotrockenmassekonzentrationen von  $4,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei beiden Temperaturprofilen gemessen. Sowohl die Raum-Zeit-Ausbeute als auch die Wachstumsraten nahmen bei beiden Temperaturverläufen sehr ähnliche Werte an. Die Raum-Zeit-Ausbeuten lagen bei  $0,78$  bzw.  $0,80 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die maximalen Wachstumsraten wurden bei Prozesszeiten zwischen  $1,9$  und  $2,3 \text{ d}$  erreicht und unter Prozesstag 2 in Abbildung 5.8 dargestellt.



**Abbildung 5.8:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozesstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5 mit „BG11+“-Medium mit einem Lichtprofil des 15. Juni 1012 (Almería, Spanien). Das Temperaturprofil von Almería (Spanien) (15-30 °C, hellgrau) wurde um 5 °C auf 20-35°C (dunkelgrau) erhöht. Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Die maximalen  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen lagen bei einem Tagesverlauf der Temperatur zwischen 20-35 °C bei  $4,3 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$  und bei einem Temperaturverlauf zwischen 15-30 °C bei  $4,0 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Die dabei erreichten maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalte in den Zellen lagen zwischen  $0,93$  und  $1,19 \text{ mg L}^{-1}$ .

## Diskussion

Mit dem Vergleich von Wachstum und Produktbildung bei verschiedenen Temperaturverläufen zwischen 15-30 °C bzw. 20-35 °C konnte gezeigt werden, dass *D. salina* in einem weiten Temperaturbereich gleichbleibendes Wachstum und kaum veränderte  $\beta$ -Carotin-Bildung aufweist. Im Allgemeinen weisen die meisten Mikroalgenstämme Wachstumsoptima zwischen 22-35 °C auf (Singh & Singh, 2015). Aufgrund verringerter Enzymaktivität kann es bei vom Temperaturoptimum abweichenden Temperaturen jedoch zu verlangsamtem Wachstum kommen. Da *D. salina* CCAP19/18 allerdings kein erhöhtes Absterben während der kalten Nachtphase aufwies, scheint der Stamm auch niedrige

Temperaturen bis 15 °C zu tolerieren. Darüber hinaus ist bei Temperaturen bis 35 °C keine Abnahme des Wachstums zu beobachten.

Der Einfluss der Temperatur auf die  $\beta$ -Carotin-Konzentration wurde bislang nur unter konstanten Bedingungen untersucht. Die dabei veröffentlichten, widersprüchlichen Ergebnissen zeigen einerseits, dass die  $\beta$ -Carotin-Konzentration temperaturunabhängig ist (Orset & Young, 1999), andererseits wurde bei verringerter Temperatur eine Steigerung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration beobachtet (Ben-Amotz, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Carotin-Produktion mit *D. salina* CCAP19/18 bei Tagesganglinien im Temperaturbereich zwischen 15-35 °C nicht von der Temperatur beeinflusst wird.

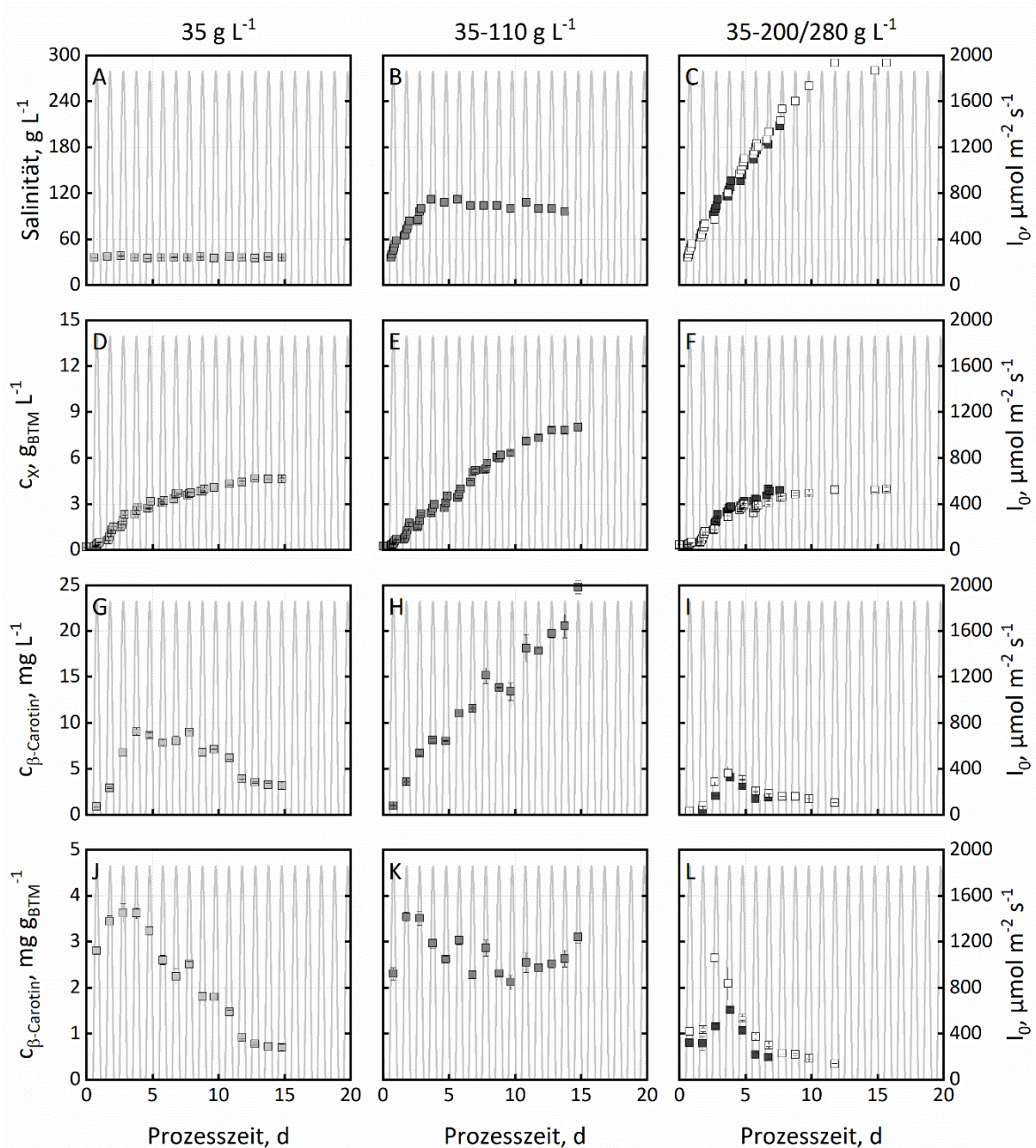
Da *D. salina* allgemein als sehr salztolerant bekannt ist und Salinitäten bis zur Sättigungskonzentration überleben kann (Borowitzka & Borowitzka, 1990), war das Abflachen von Wachstumskurve und  $\beta$ -Carotin-Konzentration bei einer Salinität von 110 g L<sup>-1</sup> unerwartet. Mögliche Faktoren hierfür könnten die Limitierung durch den hohen Salzgehalt, Nährstoffmangel oder Lichtlimitierung sein.

#### 5.4 Satzprozesse bei verschiedenen Salzprofilen

Dafür wurden Satzprozesse bei Tagesganglinien der Lichtintensität und der Temperatur (15. Juni 2012, Almería, Spanien) mit „BG11+“-Medium bei pH 8,5 durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Salzprofile angewendet. Ein Referenzprozess fand bei einer konstanten Salinität von 35 g L<sup>-1</sup> statt, was der Salzkonzentration von Meerwasser entsprach. Damit wurden Satzprozesse mit einer Salzsteigerung von 35-200 bzw. 280 g L<sup>-1</sup> NaCl verglichen. Die Steigung der Konzentrationszunahme entsprach dem Verdunstungsausgleich in Flachgerinnereaktoren mit Meerwasser. Aufgrund der bereits zuvor beobachteten Abflachung von Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion ab einem Salzgehalt von 110 g L<sup>-1</sup> im Medium wurde darüber hinaus ein Satzprozess durchgeführt, bei dem die Salzsteigerung mit der vorher beschriebenen Steigung bei einer Salzkonzentration von 110 g L<sup>-1</sup> gestoppt wurde (vgl. Abbildung 4.4B). Die Zusammenfassung von Salinitätsverläufen, Wachstumskurven,  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen und  $\beta$ -Carotin-Gehalten bei verschiedenen Salzprofilen sind in Abbildung 5.9 zusammengefasst.

Die Überprüfung der vorliegenden Salinität als Funktion der Prozesszeit zeigt die vorgegebenen Verläufe (vgl. Abbildung 5.9A-C). Bei einer konstanten Salinität von 35 g L<sup>-1</sup> NaCl konnte bis zu einer Prozesszeit von 4 d exponentielles Wachstum beobachtet werden. Im Anschluss wies die Wachstumskurve lineares Wachstum bis zu einer Prozesszeit 12 d auf, woraufhin die stationäre Wachstumsphase erreicht wurde. Während der exponentiellen Wachstumsphase stieg die  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Medium bis zu einem Maximum von 9,0 mg L<sup>-1</sup>. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit 3,6 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> auch der maximale  $\beta$ -Carotin-Gehalt der Zellen erreicht. Über die weitere Prozesszeit gesehen, nahm der  $\beta$ -Carotin-Gehalt bis zu Gehalten < 1 mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> ab. Bei einer Salzsteigerung

zwischen 35-200/280 g L<sup>-1</sup> NaCl wurde ein ähnlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration beobachtet wie in vorherigen Satzprozessen. Die niedrigere erreichte Endsalinität ist hier auf die kürzere Prozesszeit zurückzuführen.

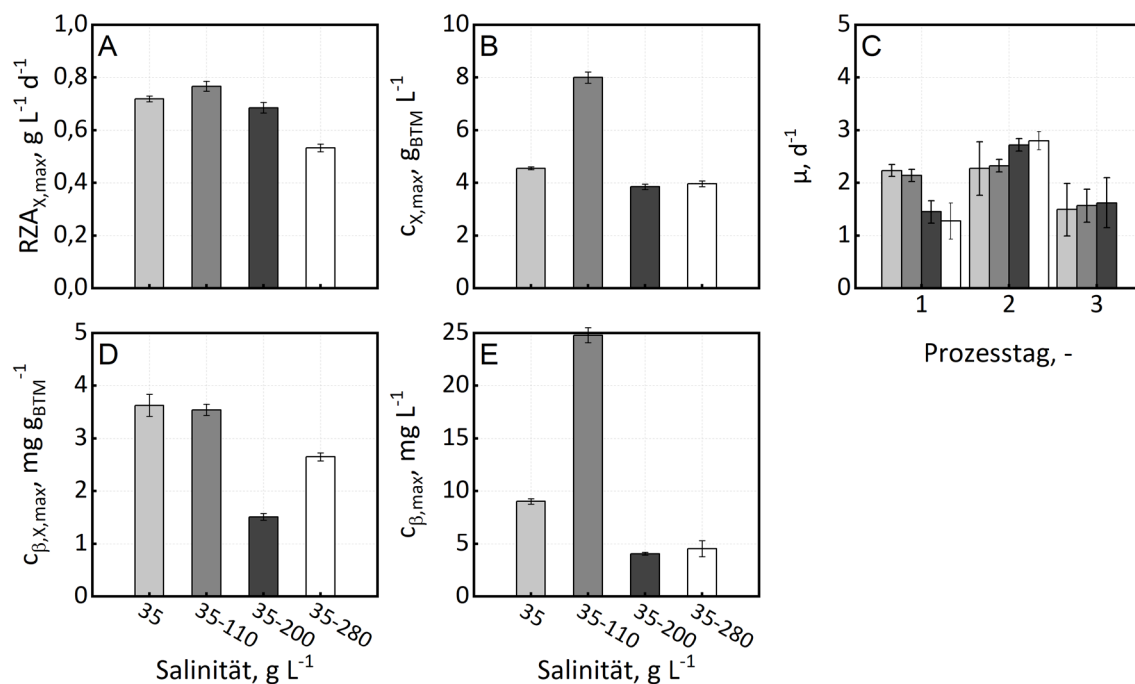


**Abbildung 5.9:** Darstellung der Salinität (A, B, C), der Biotrockenmassekonzentrationen (D, E, F), der  $\beta$ -Carotin-Konzentration (G, H, I) und des  $\beta$ -Carotin-Gehalts (J, K, L) bei Satzprozessen mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren mit „BG11+“-Medium bei pH 8,5. Die Salinität war konstant bei 35 g L<sup>-1</sup> (hellgrau) oder wurde von 35 auf 110 g L<sup>-1</sup> (grau) oder 280 g L<sup>-1</sup> NaCl (weiß, dunkelgrau) gesteigert. Temperaturprofil (15-30 °C) und Eingangsphotonenflussdichte (0-1850  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) entsprachen den Klimadaten des 15. Juni 2012 in Almería (Spanien).

Auch hier wurden die maximalen  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen nach Prozesszeiten zwischen 3,7-3,8 d erreicht. Diese lagen mit  $4,1 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$  und  $4,5 \pm 0,7 \text{ g L}^{-1}$  deutlich niedriger als im Satzprozess mit

konstanter Salinität. Auch die  $\beta$ -Carotin-Gehalte waren mit  $1,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  und  $2,7 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  geringer. Die anschließende Abnahme des  $\beta$ -Carotin-Gehalts resultierte in Gehalten  $< 0,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Da in allen Satzprozessen mit Salzsteigerung eine Abnahme des  $\beta$ -Carotin-Gehalts nach etwa 3,8 d und einer damit verbundenen Salinität von  $110 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  auftrat, wurde in einem zusätzlichen Satzprozess die Salzsteigerung bei dieser kritischen Salinität gestoppt. Die Wachstumskurve im Satzprozess mit einer Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  und anschließend konstanter Salinität wies nach der exponentiellen Wachstumsphase eine deutlich erkennbare lineare Wachstumsphase auf. Sowohl Biotrockenmasse- als auch  $\beta$ -Carotin-Konzentration stiegen bis zu einer Prozesszeit von 14,8 d kontinuierlich. Die maximal erreichte  $\beta$ -Carotin-Konzentration lag bei  $25 \text{ mg L}^{-1}$  und der  $\beta$ -Carotin-Gehalt schwankte über die Prozesszeit zwischen 2,1 und  $3,1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ .

Eine Zusammenfassung ermittelter Zustandsgrößen, die die Beurteilung von Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Bildung vereinfachen, ist in Abbildung 5.10 gezeigt.



**Abbildung 5.10:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozesstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5 mit „BG11“-Medium bei Temperatur- und Lichtverläufen des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien). Die Salzprofile entsprachen einem Referenzprozess bei konstanter Salinität von  $35 \text{ g L}^{-1}$  (hellgrau), der Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  (grau) und einer Erhöhung der Salinität auf 200 (dunkelgrau), bzw.  $280 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  (weiß). Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Die maximale Raum-Zeit-Ausbeute der Biotrockenmasse lag im Satzprozess mit einer Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  mit  $0,77 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  höher als bei konstanter Salinität ( $0,72 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und Salzsteigerung bis  $200/280 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  ( $0,68/0,53 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Mit  $8,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  lag die maximale

Biotrockenmassekonzentration zwischen 73 % und 100 % höher als bei konstantem Salzgehalt oder Salzsteigerung bis 200/280 g L<sup>-1</sup> NaCl. An den Prozesstagen 1-3 zeigten sich trotz unterschiedlicher Salzprofile nur geringe Unterschiede in den ermittelten Wachstumsraten. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration konnte bei Salzsteigerung bis 110 g L<sup>-1</sup> sogar auf das beinahe Dreifache (35 g L<sup>-1</sup>) bzw. Sechsfache (35-200/280 g L<sup>-1</sup>) gesteigert werden. Der höchste  $\beta$ -Carotin-Gehalt lag mit  $3,6 \pm 0,2$  mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup> bei konstanter Salinität. In einem ähnlichen Bereich ( $3,5 \pm 0,1$  mg g<sub>BTM</sub><sup>-1</sup>) lag auch der  $\beta$ -Carotin-Gehalt bei einer Salzsteigerung bis 110 g L<sup>-1</sup>.

## Diskussion

Die Durchführung von Satzprozessen bei unterschiedlichen Salinitätsprofilen bei Licht- und Temperaturverläufen eines Sommertags in Südspanien und pH 8,5 mit „BG11+“-Medium führte zur Identifizierung einer geeigneten Salinität für Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion von *D. salina* CCAP19/18. Bei einer Steigerung bis 110 g L<sup>-1</sup> NaCl wurde die höchste  $\beta$ -Carotin-Konzentration und die höchste Biotrockenmassekonzentration erreicht. Zusätzlich konnte der  $\beta$ -Carotin-Gehalt über die Prozesszeit konstant gehalten werden, wohingegen er bei höheren Salinitäten oder konstanter Salinität stark sank.

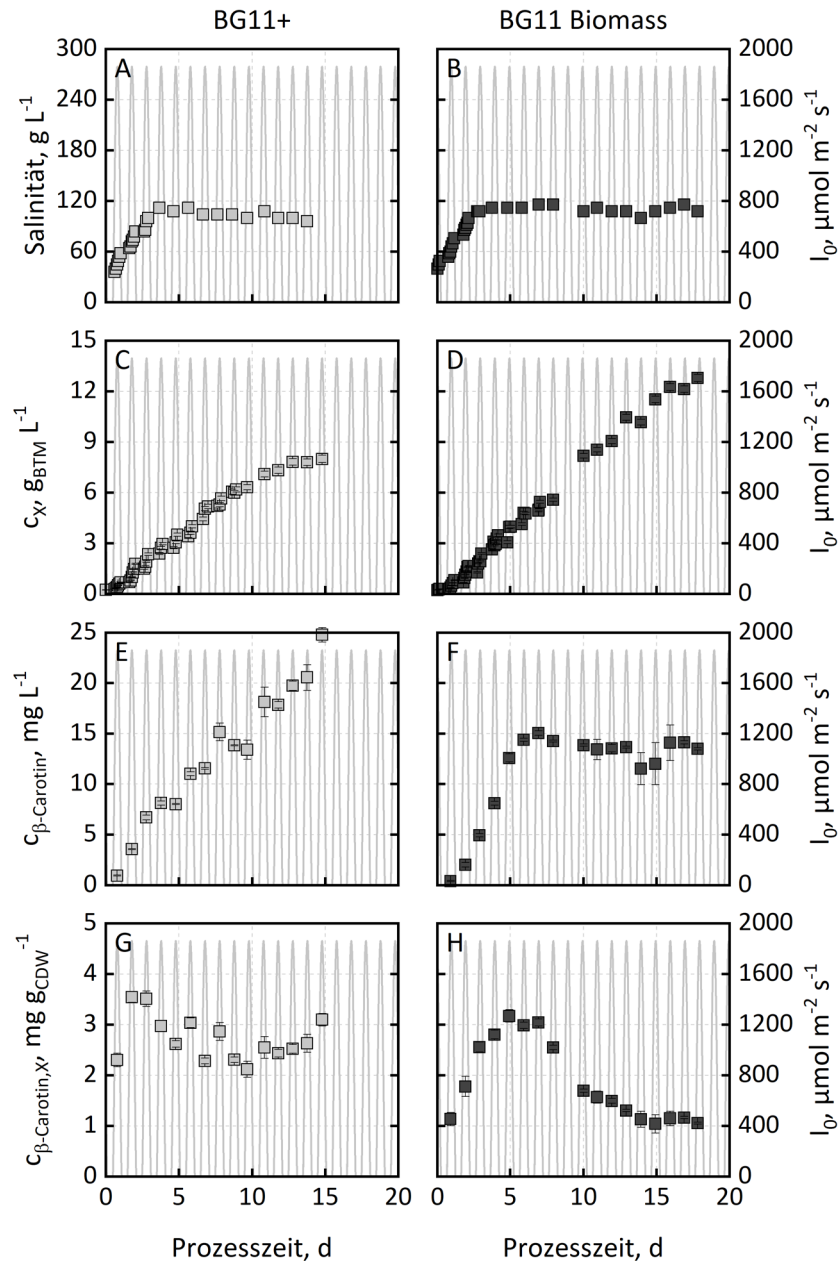
Die meisten *D. salina*-Stämme sind bekannt dafür, bei sehr hohen Salinitäten bis zu 270 g L<sup>-1</sup> NaCl  $\beta$ -Carotin zu bilden, jedoch nur bis zu Salzkonzentrationen zwischen 180-210 g L<sup>-1</sup> NaCl wachsen zu können (Borowitzka *et al.*, 1984; Borowitzka & Borowitzka, 1990). Das beste Wachstum und die höchste  $\beta$ -Carotin-Bildung mit einem Isolat von *D. salina* wurde zwischen 88 und 175 g L<sup>-1</sup> NaCl nachgewiesen (Farhat *et al.*, 2011). Die höchste  $\beta$ -Carotin-Bildung mit *D. salina* CCAP19/18 in Schüttelkolben wurde bei der höchsten untersuchten Salinität von 116,9 g L<sup>-1</sup> bei einer Temperatur von 34 °C und einer Eingangsphotonenflussdichte von 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  festgestellt (Fazeli *et al.*, 2006). Die in dieser Studie veröffentlichten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen von 25 mg L<sup>-1</sup>, die unter Tagesganglinien eines Sommertags in Spanien bei einer Salzsteigerung bis 110 g L<sup>-1</sup> in Flachplatten-Photobioreaktoren erreicht werden konnten, waren dreimal höher als bereits veröffentlichte Gesamtcarotinoidkonzentrationen von 8,6 mg L<sup>-1</sup> ohne Angabe von  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen oder -Gehalten (Fazeli *et al.*, 2006).

## 5.5 Satzprozesse mit unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzung

Da Nährstoffkonzentrationen einen großen Einfluss auf Wachstum und Metabolismus von Mikroalgen darstellen, wurde ein Medium an die Zusammensetzung mariner Mikroalgen (Grobelaar, 2013; Gualtieri & Barsanti, 2006) angepasst, das Nährstofflimitierungen vermeiden sollte. Das „BG11 Biomass“-Medium wurde in Tabelle 4.1 vorgestellt und enthält verglichen mit „BG11+“-Medium die dreifache Menge an K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, die achtfache Menge an MgSO<sub>4</sub> sowie die doppelte Menge an



Ammoniumeisencitrat. Die im Folgenden verglichenen Satzprozesse mit *D. salina* CCAP19/18 bei pH 8,5 und Tagesganglinien von Licht und Temperatur mit einer Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl mit den beiden verschiedenen Medienzusammensetzungen sind in Abbildung 5.11 zusammengefasst.



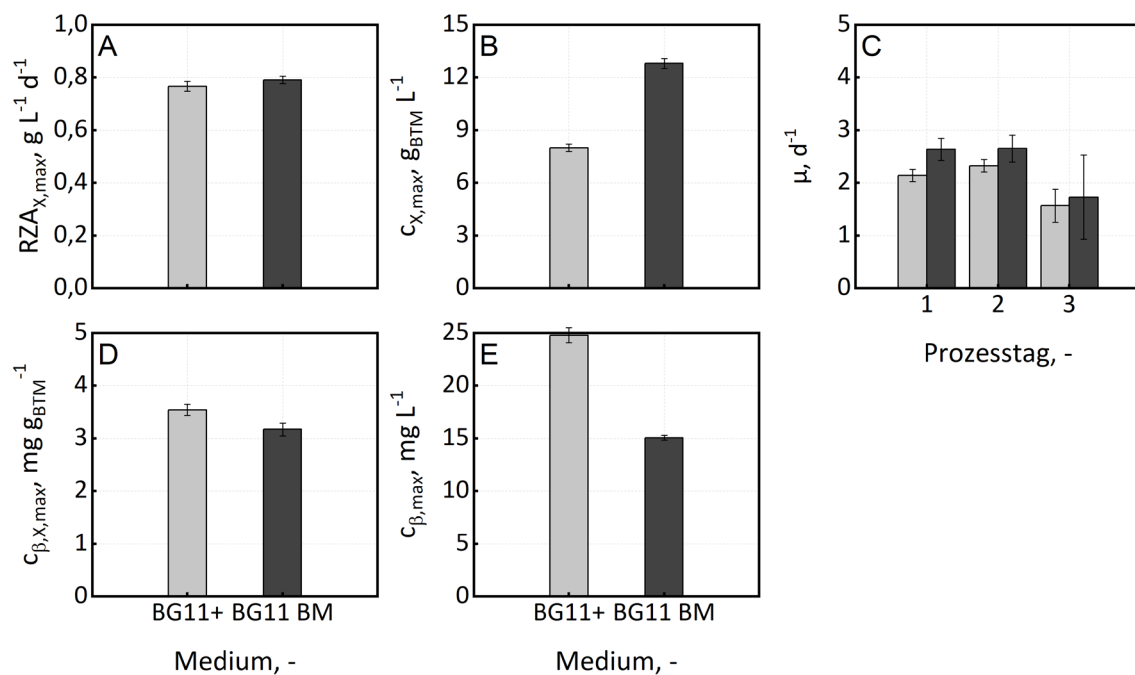
**Abbildung 5.11:** Darstellung der Salinität (A, B), der Biotrockenmassekonzentrationen (C, D), der  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E, F) und des  $\beta$ -Carotin-Gehalts (G, H) bei Satzprozessen mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5. Bei den verwendeten Medien handelt es sich um „BG11+“ und „BG 11 Biomass“. Die Salinität wurde von  $35$  auf  $110 \text{ g L}^{-1}$  gesteigert. Temperaturprofil ( $15$ - $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und Eingangsphotonenflussdichte ( $0$ - $1850 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) entsprachen den Klimadaten des 15. Juni 2012 in Almería (Spanien).

Wie im Satzprozess mit „BG11+“-Medium ist auch bei Verwendung von „BG11 Biomass“-Medium nach der exponentiellen Wachstumsphase eine lange lineare Wachstumsphase erkennbar. Durch die veränderte Nährstoffzusammensetzung hält diese allerdings deutlich länger an, so dass nach einer



Prozesszeit von 17,8 d eine maximale Biotrockenmassekonzentration von  $12,8 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht wurde. Im Gegensatz zu der kontinuierlich ansteigenden  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Satzprozess mit „BG11+“-Medium wurde bei Verwendung von „BG11 Biomass“-Medium ein Anstieg bis  $15 \text{ mg L}^{-1}$  beobachtet. Im Anschluss blieb die  $\beta$ -Carotin-Konzentration relativ konstant bei  $13,6 \pm 0,9 \text{ mg L}^{-1}$ . Das spiegelte sich auch in einem Anstieg des  $\beta$ -Carotin-Gehalts auf  $3,0 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bis zu einer Prozesszeit zwischen 5 und 7 d wider, woraufhin der  $\beta$ -Carotin-Gehalt stark abnahm.

Der Vergleich verschiedener für das Wachstum und die  $\beta$ -Carotin-Produktion charakteristischer Zustandsgrößen ist in Abbildung 5.12 dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass die Biomassekonzentration im Satzprozess mit „BG11 Biomass“-Medium verglichen mit dem Satzprozess mit „BG11+“-Medium um 60 % gesteigert werden konnte. Die Raum-Zeit-Ausbeuten beider Satzprozesse waren mit  $0,77 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für „BG11+“ und  $0,79 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  vergleichbar. Die mit exponentieller Regression angenäherten Wachstumsraten in den ersten drei Tagen der Prozesse lagen in einer ähnlichen Größenordnung, wobei sie tendenziell im Satzprozess mit „BG11 Biomass“-Medium leicht höher waren.



**Abbildung 5.12:** Vergleich der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute der Biomasse (A), der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (B), der Wachstumsraten an den Prozesstagen 1-3 (C), des maximalen  $\beta$ -Carotin-Gehalts (D) sowie der maximal erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentration (E) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5 unter Anwendung von Licht- und Temperaturverläufen des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien) mit einer Salzsteigerung von  $35\text{-}110 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ . Bei den verwendeten Medien handelte es sich um „BG11+“- (hellgrau) und „BG11 Biomass“-Medium (dunkelgrau). Die Fehlerbalken wurden mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus technischen Triplikaten ermittelt.

Im Gegensatz zu Verbesserungen des Wachstums führte eine Verwendung des „BG11 Biomass“-Mediums zu einer Verringerung der maximalen  $\beta$ -Carotin-Konzentration um 40 %. Der maximal

erreichte  $\beta$ -Carotin-Gehalt lag mit  $3,0 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  zwar im gleichen Intervall wie unter Verwendung von „BG11+“-Medium, allerdings wurde der Gehalt nicht über die gesamte Prozesszeit gehalten.

### Diskussion

Beim Vergleich zweier Satzprozesse mit den beiden unterschiedlichen Medien konnte gezeigt werden, dass die Nährstoffzusammensetzung einen starken Einfluss auf Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion mit *D. salina* CCAP19/18 hat. Die maximal erreichten Raum-Zeit-Ausbeuten der Biomasse waren in beiden Satzprozessen trotz unterschiedlicher Nährstoffverfügbarkeit vergleichbar und könnten so auf eine Lichtlimitierung hindeuten. Trotzdem lagen sie mehr als 50mal so hoch, wie bisher veröffentlichte Raum-Zeit-Ausbeuten von  $15 \text{ mg}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  in Flachplatten-Photobioreaktoren bei photoautotrophen Bedingungen (Khadim *et al.*, 2018). Die bisher höchsten veröffentlichten Raum-Zeit-Ausbeuten von *D. salina*-Biomasse lagen mit  $0,54 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  um 31 % niedriger als in der vorliegenden Arbeit und wurden in Rohrreaktoren mit  $\text{CO}_2$ -Zufuhr und 12 h/12 h-Tag-Nacht-Zyklen erreicht (Kim *et al.*, 2012).

Die maximale volumetrische  $\beta$ -Carotin-Produktivität von  $2,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  wurde im Prozess mit „BG11+“-Medium erreicht, in dem auch die maximale  $\beta$ -Carotin-Konzentration gemessen werden konnte. Über die gesamte Prozesszeit gesehen lag die volumetrische  $\beta$ -Carotin-Produktivität bei  $1,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . In der Literatur wurde nach einer 10-tägigen Stressphase ebenfalls über den gesamten Prozess eine  $\beta$ -Carotin-Produktivität von  $1,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht, wobei das Maximum bei  $1,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  lag (Shaker *et al.*, 2017). Unter Verwendung eines Blasensäulenreaktors konnte eine volumetrische  $\beta$ -Carotin-Produktivität von  $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht werden (Wu *et al.*, 2016).

Ein möglicher Grund für die Abnahme des  $\beta$ -Carotin-Gehaltes in den Zellen könnte eine Lichtlimitierung sein, die im Folgenden näher betrachtet werden soll. Zum anderen könnte die Stabilisierung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts über die Prozesszeit im Satzprozess mit „BG11+“-Medium von der unterschiedlichen Medienzusammensetzung kommen. Verglichen mit dem „BG11 Biomasse“-Medium könnte hier ein Mangel an Phosphat, Ammoniumeisencitrat oder  $\text{MgSO}_4$  verantwortlich sein.

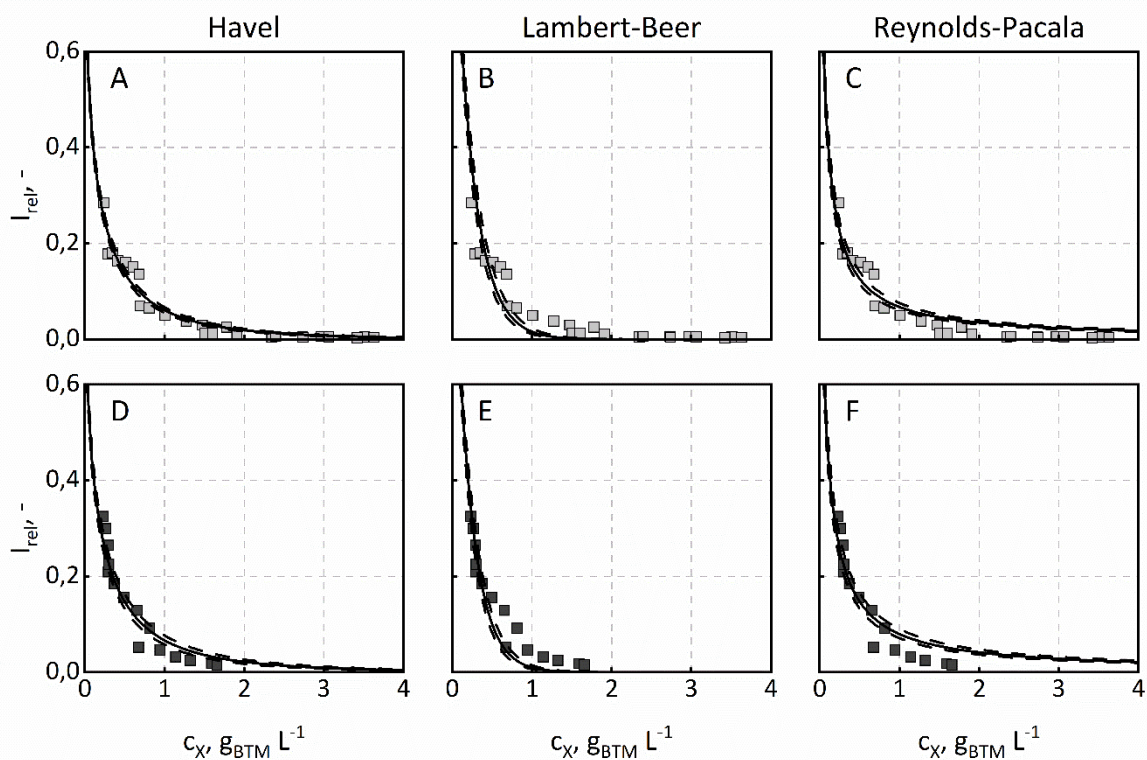
### 5.6 Einfluss der Lichtverfügbarkeit auf Wachstum und $\beta$ -Carotin-Bildung

Um die Hypothese einer Limitierung der Lichtverfügbarkeit zu überprüfen, wurde untersucht, ab welcher Biotrockenmassekonzentration eine Lichtlimitierung zu erwarten ist. Dazu musste zunächst ein geeignetes Modell zur Lichtabschwächung mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren identifiziert werden. Zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten bei unterschiedlichen Eingangspotonenflussdichten bot es sich an, die relative Photonenflussdichte

$I_{\text{rel}} = \frac{I(t)}{I_0(t)}$  statt der Photonenflussdichte nach Austritt aus dem Medium  $I(t)$  (vgl. Kapitel 4.4.1-4.4.2)

zu verwenden (vgl. Gleichung 3.17). Die graphische Darstellung von  $I_{rel}$  als Funktion der Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  der Satzprozesse mit den beiden verwendeten Medien „BG11+“ und „BG11 Biomass“ sowie deren Beschreibung mit unterschiedlichen Lichtabschwächungsmodellen ist in Abbildung 5.13 gezeigt.

Die ermittelten Extinktionskoeffizienten sowie die zugehörigen Grenzen des 95 %-Konfidenzintervalls aus den dargestellten Satzprozessen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Zusätzlich wurden Standardabweichungen der ermittelten Modellparameter, Fehlerquadratsummen und Bestimmtheitsmaß ermittelt und zum Vergleich der Modelle genutzt.



**Abbildung 5.13:** Darstellung der relativen Photonenflussdichte  $I_{rel} = \frac{I(t)}{I_0(t)}$  (vgl. Kapitel 4.4.2) in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration  $c_X$ . Die relative Photonenflussdichte und die korrespondierende Biotrockenmassekonzentration wurden mit „BG11+“-Medium (hellgrau) und „BG11 Biomass“-Medium (dunkelgrau) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren bei pH 8,5, einer Salzsteigerung von 35-110 g L<sup>-1</sup> NaCl bei Licht- und Temperaturverläufen des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien) erfasst und mit Lichtabschwächungsmodellen (durchgezogene Linie) interpoliert. Bei den verwendeten Modellen handelte es sich um ein nach Havel modifiziertes Lambert-Beer-Gesetz (A, D, Gleichung 3.17), das Lambert-Beer-Gesetz (B, E, Gleichung 3.16) sowie Reynolds und Pacala (C, F, Gleichung 3.18). Die 95 %-Konfidenzintervalle sind kaum sichtbar (gestrichelte Linie).

Die Datensätze beider Satzprozesse wiesen für das Lichtabschwächungsmodell nach Havel das höchste Bestimmtheitsmaß auf ( $R^2 > 0,93$ ). Darüber hinaus lagen die Fehlerquadratsummen niedriger als die der anderen Modelle. Auch die Standardabweichung der Extinktionskoeffizienten lag für das Modell nach Havel niedriger ( $SD \leq 0,04$ ). Das lässt darauf schließen, dass das Lichtabschwächungsmodell nach

Havel für Satzprozesse mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren am besten geeignet ist.

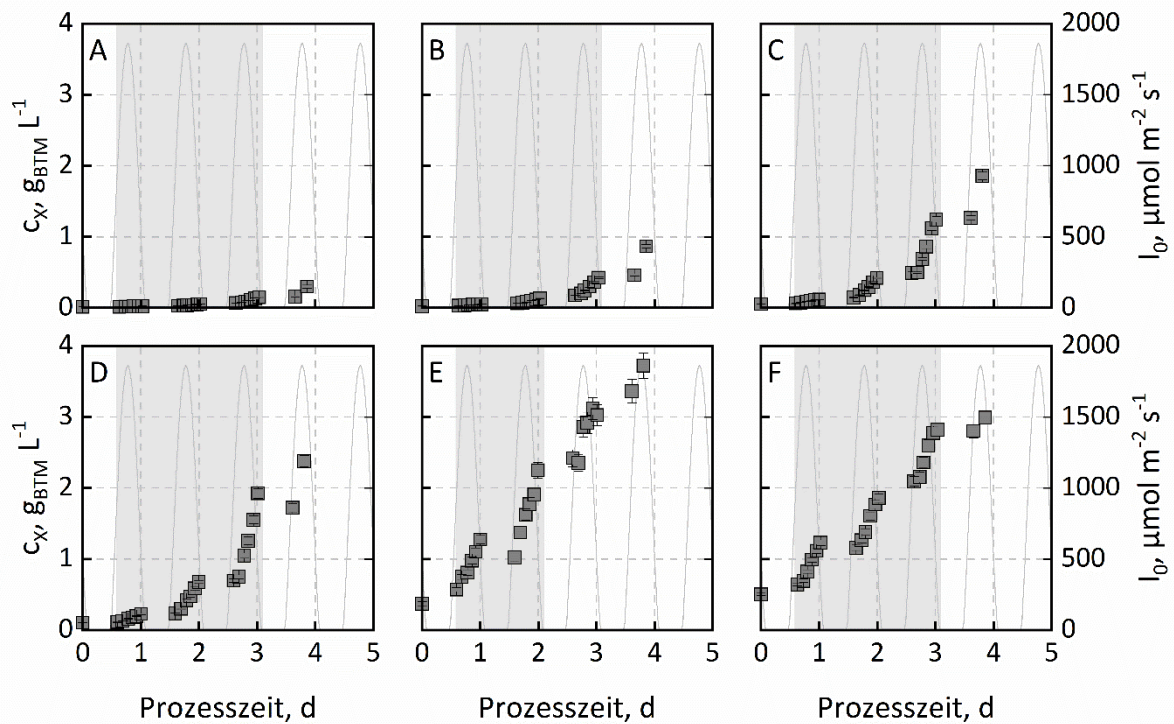
Aus den Messdaten in Abbildung 5.13 wird ersichtlich, dass bei einer Biotrockenmassekonzentration von etwa  $3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in Satzprozessen bei unterschiedlicher Nährstoffzusammensetzung nach 2 cm Algensuspension nahezu kein Licht mehr austritt. Nach dem Lichtabschwächungsmodell nach Havel werden 99 % des Lichts bereits bei Biomassekonzentrationen von  $2,7\text{-}2,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  absorbiert.

**Tabelle 5.1:** Geschätzte Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  mit Untergrenze (unteres  $\epsilon$ ) und Obergrenze (oberes  $\epsilon$ ) des 95 % Konfidenzintervalls verschiedener Lichtabschwächungsmodelle nach Gleichungen 3.16-3.18. Die Bestimmung erfolgte mit Matlab aus den in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren mit *D. salina* CCAP19/18 unter Verwendung von „BG11+“- und „BG11 Biomass“-Medium erfassten relativen Photonendichten  $I_{\text{rel}} = \frac{I(t)}{I_0(t)}$  (vgl. Kapitel 4.4.2) und Biotrockenmassekonzentrationen  $c_X$  (Standardabweichung SD, Fehlerquadratsumme SSE, Bestimmtheitsmaß  $R^2$ ).

| Bedingungen                    | Modell          | 95 % Konfidenzintervall |      |   |                   | SSE   | $R^2$ |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------|------|---|-------------------|-------|-------|
|                                |                 | $\epsilon$              | SD   | unteres $\epsilon$                                | oberes $\epsilon$ |       |       |
|                                |                 |                         |      | $\text{cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$ |                   |       |       |
| „BG11+“                        | Havel           | 1,40                    | 0,02 | 1,35  | 1,45              | 2,37  | 0,94  |
| pH 8,5                         | Lambert Beer    | 2,06                    | 0,10 | 1,88  | 2,25              | 10,74 | 0,71  |
| 3,5-110 $\text{g L}^{-1}$ NaCl | Reynolds-Pacala | 6,89                    | 0,41 | 6,08  | 7,69              | 4,69  | 0,87  |
| „BG11 Biomass“                 | Havel           | 1,35                    | 0,04 | 1,28  | 1,43              | 3,15  | 0,93  |
| pH 8,5                         | Lambert Beer    | 2,30                    | 0,10 | 2,10  | 2,49              | 6,83  | 0,84  |
| 3,5-110 $\text{g L}^{-1}$ NaCl | Reynolds-Pacala | 5,77                    | 0,38 | 5,03  | 6,50              | 4,33  | 0,90  |

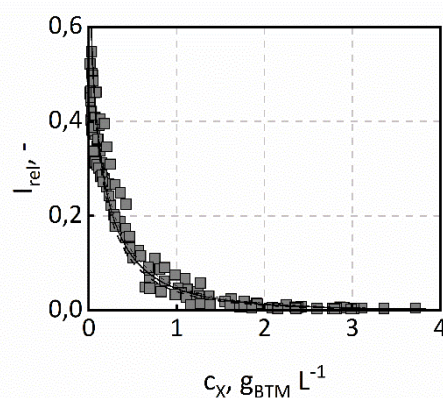
Zusätzlich zu nahezu vollständiger Absorption der Photonendichte bei hohen Zelldichten kann bei niedrigen Zelldichten Lichtinhibierung auftreten. Zur Identifikation einer geeigneten Lichtverfügbarkeit, bei der weder Lichtlimitierung noch -inhibierung auftritt, musste aufgrund der Anwendung von Tagesganglinien von Licht und Temperatur und damit verbundenen gleichbleibenden Dynamiken der Eingangsphtonendichten die Animpfdichte in den Satzprozessen variiert werden. Daher wurden Satzprozesse mit verschiedenen Animpfdichten zwischen  $0,01\text{-}0,50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei pH 8,5 mit „BG11+“-Medium und steigender Salzkonzentration ( $35\text{-}110 \text{ g L}^{-1}$ ) durchgeführt, um mit durch Biomasse-bedingter variabler Lichtabsorption in der Algensuspension einen breiten Bereich der Lichtverfügbarkeit abzudecken. Die ermittelten Wachstumskurven sind in Abbildung 5.14 zusammengefasst.

Bei sehr niedrigen Animpfdichten  $< 0,03 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  war zu Beginn der Prozesse bei einer Schichtdicke von 2 cm nur eine sehr langsame Zunahme der Biotrockenmassekonzentration zu beobachten. Die Satzprozesse mit den höchsten Animpfdichten  $> 0,37 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  wiesen hingegen bereits direkt zu Beginn der Prozesszeit eine starke Biomassezunahme auf.



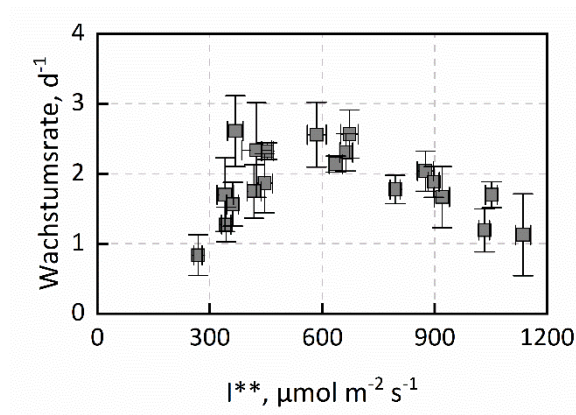
**Abbildung 5.14:** Satzprozesse in Flachplatten-Photobioreaktoren mit *D. salina* CCAP19/18 bei pH 8,5, einer steigenden Salinität von 35-110 g L<sup>-1</sup> NaCl unter Anwendung von Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15. Juni 2012, Almería, Spanien). Die Satzprozesse wurden mit Animpfdichten von 0,010 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (A), 0,03 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (B), 0,06 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (C), 0,10 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (D), 0,37 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (E) und 0,50 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> (F) inokuliert. Die grau hinterlegte Fläche markiert den Zeitraum, in dem tageweise Wachstumsraten bestimmt wurden.

Aus den Biotrockenmassekonzentrationen und den zugehörigen relativen Photonenflussdichten der gezeigten Satzprozesse mit unterschiedlichen Animpfdichten wurde mit dem modifizierten Lambert-Beer-Gesetz nach Havel der Extinktionskoeffizient ermittelt (Abbildung 5.15).



**Abbildung 5.15:** Die relative Photonenflussdichte  $I_{rel} = \frac{I(t)}{I_0(t)}$  in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration aus Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren mit *D. salina* CCAP19/18 (pH 8,5, Salzsteigerung von 35-110 g L<sup>-1</sup>, Tagesganglinien nach Almería, Spanien) mit unterschiedlichen Animpfdichten. Der Verlauf der relativen Photonenflussdichte wurde mit dem nach Havel modifizierten Lambert-Beer-Gesetz interpoliert (durchgezogene Linie). Das 95 %-Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) ist eingezeichnet. Der so identifizierte Extinktionskoeffizient war  $1,54 \pm 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$  ( $R^2=0,88$ ).

Der daraus ermittelte Extinktionskoeffizient lag bei  $1,54 \pm 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$ . Dieser wurde zusammen mit den exponentiellen Wachstumsraten, die für jeden Tag unter der Annahme exponentiellen Wachstums im grau hinterlegten Bereich in Abbildung 5.14 gesondert nach Gleichung 3.4 bestimmt wurden, zur Berechnung der mittleren integralen Photonenflussdichte genutzt. Der so errechnete Zusammenhang zwischen exponentiellen Wachstumsraten und mittlerer integraler Photonenflussdichte ist in Abbildung 5.16 gezeigt.



**Abbildung 5.16:** Zusammenhang zwischen experimentell ermittelten, exponentiellen Wachstumsraten und mittleren integralen Photonenflussdichten in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren mit *D. salina* CCAP19/18 bei pH 8,5 und steigendem Salzgehalt bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl mit „BG11+“-Medium bei Licht- und Temperaturverläufen des 15. Juni 2012 in Almería (Spanien). Die Fehlerbalken resultieren aus der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung anfallender Messfehler (vgl. Kapitel 4.4.3).

Aus der Auftragung der Messdaten wird ersichtlich, dass die maximalen Wachstumsraten mit  $2,6 \text{ d}^{-1}$  bei mittleren integralen Photonenflussdichten im Bereich von  $400\text{-}750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auftraten. Niedrigere mittlere integrale Photonenflussdichten führten zu einer Lichtlimitierung, während höhere Photonenflussdichten eine Lichtinhibierung bewirken, so dass die Wachstumsrate bei etwa  $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf die Hälfte des Maximums reduziert war.

Zur mathematischen Beschreibung der Wachstumsrate als Funktion der mittleren integralen Photonenflussdichte wurden verschiedene Inhibitionskinetiken verglichen. Da bei hohen Biotrockenmassekonzentrationen und damit verbundenen niedrigen mittleren integralen Photonenflussdichten kein exponentielles Wachstum beobachtet werden konnte, wurde eine minimale mittlere integrale Photonenflussdichte  $I_{min}^*$  eingeführt, ab der exponentielles Wachstum auftrat. Dieser Zusammenhang kann mathematisch nach Gleichung 5.1 beschrieben werden.



$$\mu(I) = \begin{cases} 0 & \text{für } I^{**} < I_{min}^{**} \\ f(I^{**} - I_{min}^{**}) & \text{für } I^{**} \geq I_{min}^{**} \end{cases} \quad \text{Gleichung 5.1}$$

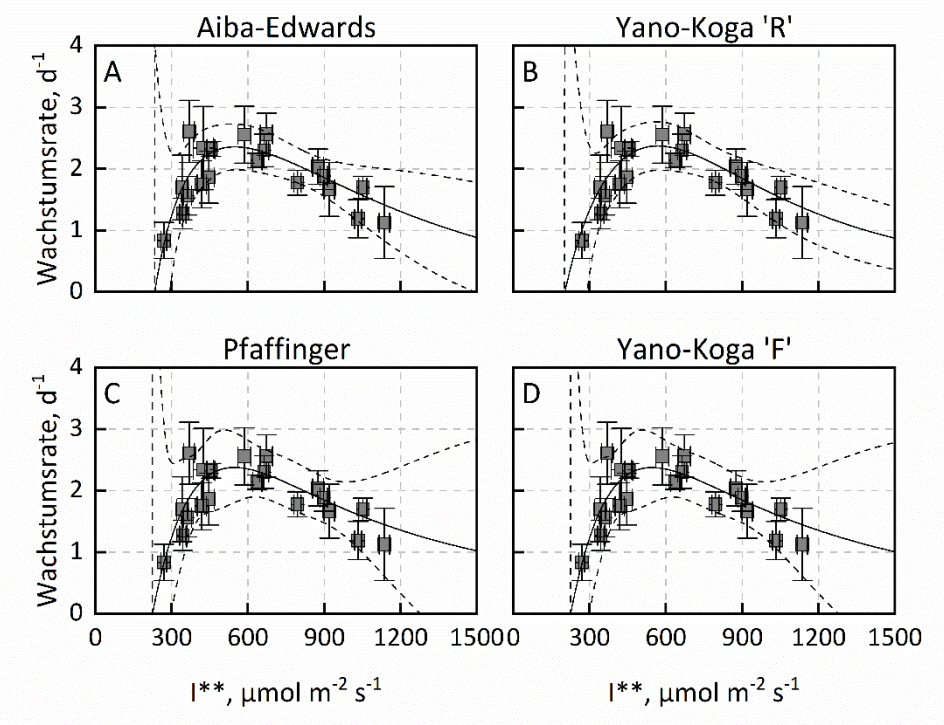
$\mu$ : spezifische Wachstumsrate,  $\text{h}^{-1}$

$I^{**}$ : mittlere integrale Photonenflussdichte,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$I_{min}^{**}$ : für exponentielles Wachstum mind. notwendige Photonenflussdichte,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

$f(I)$ : Inhibitionskinetik nach Gleichungen 3.6-3.11

Für die Abbildung von Inhibitionskinetiken übliche Modelle sind in Gleichung 3.6-3.11 beschrieben. Die Interpolation der verschiedenen Modelle auf die Wachstumsraten in Abhängigkeit der mittleren integralen Photonenflussdichte ist in Abbildung 5.17 gezeigt. Da die Modelle nach Webb und Andrews nicht zur Interpolation der Messwerte geeignet waren, werden diese im Folgenden nicht dargestellt. Die geschätzten Parameter mit Standardabweichungen sowie die Summe der quadratischen Restabweichungen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.



**Abbildung 5.17:** Darstellung der täglich in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren (Salinitätssteigerung:  $35\text{-}110 \text{ g L}^{-1}$ , dynamische Temperatur- und Lichtverläufe des 15. Juni 2012 in Almería, Spanien) ermittelten exponentiellen Wachstumsraten in Abhängigkeit der mittleren integralen Photonenflussdichte. Die Datenpunkte (graue Quadrate) wurden mit verschiedenen Modellen der Lichtinhibierung abgebildet (schwarze Linie) und mit 95 %-Konfidenzintervallen (gepunktete Linie) dargestellt. Bei den verwendeten Modellen handelt es sich um Lichtinhibierungsmodelle nach Aiba-Edwards (A), Yano-Koga ‚R‘ (B), Pfaffinger (C) und Yano-Koga ‚F‘ (D), die in den Gleichungen 3.6-3.11 zusammengefasst sind.

Zur Begrenzung für die Parameterschätzung wurde mit Beobachtung der maximalen empirisch ermittelten Wachstumsrate bei etwa  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  folgende Annahme getroffen:

$$I_{min}^{**} < 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \leq K_S < 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \leq K_I$$

Die Summe der quadratischen Restabweichung war für alle geschätzten Modelle sehr ähnlich. Der geschätzte Parameter  $K_I$  stieß bei der Parameterschätzung mit den Lichtinhibierungsmodellen nach Pfaffinger und Yano-Koga ‚F‘ an die vorgegebene untere Grenze von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Der Parameter  $K_S$  stieß sowohl bei der Parameterschätzung mit den Lichtinhibierungsmodellen nach Pfaffinger und Yano-Koga ‚R‘ an die vorgegebene untere Grenze von  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Standardabweichungen aller geschätzten Parameter lagen sehr hoch. Sowohl die Parameter, die bei der Schätzung an die vorgegebenen Grenzen stoßen, als auch die Standardabweichungen, die höhere Werte besitzen als der Parameter, sind in Tabelle 5.2 fett markiert.

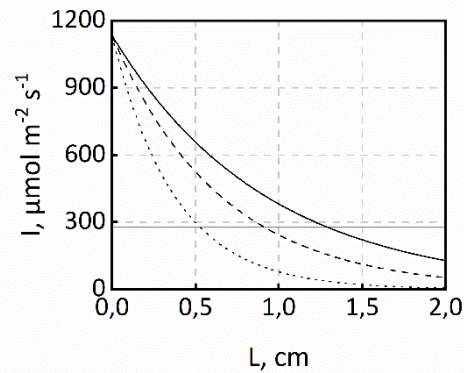
Somit scheint das Lichtinhibierungsmodell nach Aiba-Edwards im Rahmen der Beobachtungsgenauigkeit am besten für die mathematische Beschreibung der Abhängigkeit der Wachstumsrate von der mittleren integralen Photonenflussdichte geeignet zu sein. Die mit diesem Inhibitionsmodell optimale Wachstumsrate liegt mit  $2,36 \text{ d}^{-1}$  bei einer mittleren integralen Photonenflussdichte von  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  während der exponentiellen Wachstumsphase. Für exponentielles Wachstum muss die mittlere integrale Photonenflussdichte  $233 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  überschreiten. Die Sättigungskonstante wurde mit  $277 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  identifiziert, die Inhibierungskonstante lag bei  $674 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei den untersuchten Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15. Juni 2012, Almería, Spanien).

**Tabelle 5.2:** Zusammenfassung der bei der Beschreibung der Datenpunkte durch Lichtinhibierungsmodelle geschätzten Parameter, deren Standardabweichungen und die Summe der quadratischen Restabweichungen bei Normierung auf den Fehler der spezifischen Wachstumsraten (SQR).  $\mu_{max}$ : maximale Wachstumsrate,  $K_I$ : Inhibierungskonstante,  $K_{I2}$ : zweite Inhibierungskonstante (Yano-Koga ‚F‘),  $K_S$ : Sättigungskonstante,  $\varphi$ : Sensitivitätsfaktor (Pfaffinger),  $\beta$ : empirischer Faktor (Webb).

|                      | $\mu_{max}$     | $d\mu_{max}$ | $K_I$                                | $dK_I$      | $K_{I2}$ | $dK_{I2}$ | $K_S$      | $dK_S$      | $I_{min}^{**}$                       | $dI_{min}^{**}$ | $\varphi$ | $d\varphi$ | SQR |
|----------------------|-----------------|--------------|--------------------------------------|-------------|----------|-----------|------------|-------------|--------------------------------------|-----------------|-----------|------------|-----|
|                      | $\text{d}^{-1}$ |              | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |             |          |           |            |             | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ |                 | -         |            |     |
| <b>Aiba-Edwards</b>  | 7,1             | 6,9          | 674                                  | 339         | -        | -         | 277        | <b>440</b>  | 233                                  | 50              | -         | -          | 71  |
| <b>Yano-Koga 'R'</b> | 4,8             | 4,5          | 625                                  | 355         | -        | -         | <b>250</b> | <b>551</b>  | 203                                  | 113             | -         | -          | 73  |
| <b>Pfaffinger</b>    | 5,4             | <b>18,8</b>  | <b>500</b>                           | <b>1881</b> | -        | -         | <b>250</b> | <b>1408</b> | 224                                  | 106             | 1,5       | <b>2,4</b> | 71  |
| <b>Yano-Koga 'F'</b> | 6,7             | <b>31,8</b>  | <b>500</b>                           | <b>4965</b> | 759      | 582       | 317        | <b>2199</b> | 225                                  | 103             | -         | -          | 71  |

Wird nun die Verteilung der Photonenflussdichte im Flachplatten-Photobioreaktor über die Schichtdicke von 2 cm betrachtet, ergibt sich mit verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen und einer im Mittel tagsüber auftretenden Eingangspotonenflussdichten von  $1135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  folgender Zusammenhang (Abbildung 5.18). Liegt die Photonenflussdichte  $< K_S$  kann von Lichtlimitierung gesprochen werden.





**Abbildung 5.18:** Ortsabhängiger Verlauf der Photonenflussdichte nach dem Lichtabschwächungsmodell nach Havel ( $\varepsilon = 1,54 \pm 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$ ) im Flachplatten-Photobioreaktor bei einer tagsüber im Mittel vorliegenden Eingangsphotonenflussdichte von  $1135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (15. Juni 2012, Almería, Spanien) über eine Schichtdicke von 2 cm bei Zellsuspensionen mit Biotrockenmassekonzentrationen von  $0,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (durchgezogene Linie),  $1,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (gestrichelte Linie) und  $3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (gepunktete Linie). Die graue Linie stellt die Sättigungskonstante bei  $277 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  dar.

Bereits bei Biotrockenmassekonzentrationen von  $3,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  liegen etwa 75 % der Zellsuspension in einem Bereich der Photonenflussdichte  $< 277 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und sind somit lichtlimitiert.

### Diskussion

Durch die Identifizierung eines geeigneten Lichtabschwächungsmodells für *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren war es möglich, die Biotrockenmassekonzentration zu identifizieren, ab der das eingehende Licht bei einer Schichtdicke von 2 cm fast vollständig absorbiert wurde. Unabhängig vom verwendeten Medium trat eine Absorption von 99 % für die Zellen ab Biotrockenmassekonzentrationen von etwa  $2,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  auf. Die Satzprozesse mit „BG11+“- und „BG11 Biomass“-Medium erreichten diese Biotrockenmassekonzentration nach einer Prozesszeit von 5 d. Bei dieser Biotrockenmassekonzentration wurden bereits 75 % der Mikroalgensuspension mit weniger Photonen als  $277 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $K_S$ ) bestrahlt. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Erreichen des maximalen  $\beta$ -Carotins-Gehalts bei Verwendung von „BG11 Biomass“-Medium. Da die Lichtlimitierung von 75 % der Algenzellen aber bei beiden verwendeten Medien zum gleichen Zeitpunkt eintrat, kann eine Lichtlimitierung als alleiniger Grund für den abnehmenden  $\beta$ -Carotin-Gehalt im Satzprozess mit „BG11 Biomass“-Medium ausgeschlossen werden. Das weist darauf hin, dass eine Nährstofflimitierung ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  und/oder Ammoniumeisencitrat) zum konstant bleibenden  $\beta$ -Carotin-Gehalt in Zellen aus dem Satzprozess mit „BG11+“-Medium führt.

Die Identifikation eines Lichtinhibierungsmodells, das die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der mittleren integralen Photonenflussdichte darstellt, war für *D. salina* CCAP19/18 bei Einführung einer minimalen Photonenflussdichte, die benötigt wird, dass exponentielles Wachstum auftritt, im Rahmen der Beobachtungsgenauigkeit möglich. Die mit dem Inhibitionsmodell nach Aiba-Edwards bestimmte

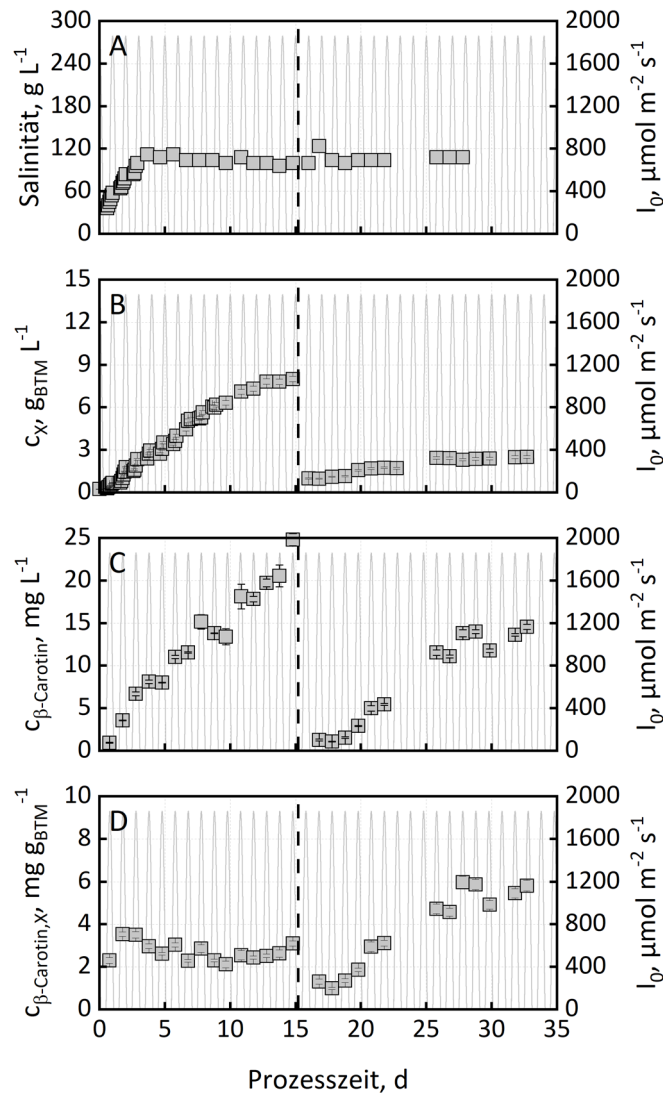
optimale mittlere integrale Photonenflussdichte lag bei  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und resultierte in einer optimalen Wachstumsrate von  $2,36 \text{ d}^{-1}$ . Zwar kann davon ausgegangen werden, dass unter einer mittleren integralen Photonenflussdichte von  $233 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kein exponentielles Wachstum beobachtet werden kann, jedoch wies *D. salina* CCAP19/18 auch bei höheren Biotrockenmassekonzentrationen bis zu  $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  in Flachplatten-Photobioreaktoren bei einer Schichtdicke von 2 cm noch lineares Wachstum auf.

Unter konstanter Bestrahlung bei  $1000$  und  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde bereits gezeigt, dass *D. salina* eine sehr hohe Toleranz gegenüber Licht besitzt (Xu *et al.*, 2016). Diese Photonenflussdichte wird pro Tag für ca. 5,5 h bis maximal  $1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  überschritten. Bei einer auftretenden Lichtinhibierung wäre während der höchsten Photonenflussdichten zur Mittagszeit ein stark inhibiertes Wachstum oder sogar eine Stagnation der Biotrockenmassekonzentration zu erwarten. Dies wurde jedoch in den Messdaten nicht beobachtet. Möglicherweise wurde der Einfluss des auf die Kultur treffenden Lichts also zusätzlich durch den Effekt einer geringen Inokulationsdichte verstärkt. Bereits mit anderen Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass eine geringe Animpfdichte zu einer Verlängerung der Verzögerungsphase führen kann (Augustin *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001). Auch bei Untersuchungen mit dem Mikroalgenstamm *Nannochloropsis gaditana* konnte mit statistischer Versuchsplanung mit den Variablen  $\text{CO}_2$ -Konzentration, Lichtintensität und Inokulationsdichte gezeigt werden, dass die Inokulationsdichte Einfluss auf das Wachstum nimmt (Hallenbeck *et al.*, 2015).

Die hier gezeigte mathematische Beschreibung der Wachstumsrate in Abhängigkeit der mittleren integralen Photonenflussdichte gilt also für Satzprozesse unter den beschriebenen Prozessbedingungen in Flachplatten-Photobioreaktoren. Für eine Maßstabsübertragung muss jedoch der Einfluss der Inokulationsdichte sowie des Reaktortyps berücksichtigt und untersucht werden.

## 5.7 Zweistufige Satzprozesse

Da eine Durchführung zweistufiger Satzprozesse als vorteilhaft für die Produktion von  $\beta$ -Carotin gilt, wurde die Biomasse aus den Satzprozessen mit dem höchsten  $\beta$ -Carotin-Gehalt bei steigender Salinität in nährstofflimitiertes „BG11 Produktion“-Medium überführt (vgl. Tabelle 4.1). Um zusätzlich eine hohe Lichtverfügbarkeit zu gewährleisten, wurde die Biotrockenmassekonzentration deutlich reduziert. Der höchste  $\beta$ -Carotin-Gehalt wurde mit *D. salina* CCAP19/18 bei einer Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$  in „BG11+“-Medium ermittelt. Der Satzprozess mit anschließender Produktionsphase ist in Abbildung 5.19 zusammengefasst.



**Abbildung 5.19:** Verlauf von Salinität (A), Biotrockenmassekonzentration (B),  $\beta$ -Carotin-Gehalt (C) und  $\beta$ -Carotin-Gehalt (D) in einem Satzprozess bei Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  mit „BG11+“-Medium bei pH 8,5 in der Wachstumsphase. Der Übergang in die Produktionsphase erfolgte durch Zentrifugation der Zellen nach 15,2 d (schwarze, gestrichelte Linie) und Resuspendieren mit verringerter Biotrockenmassekonzentration in frischem Medium. Die Salinität betrug in dieser Phase  $110 \text{ g L}^{-1}$ , das verwendete Medium war ein limitiertes „BG11“-Medium (vgl. Tabelle 4.1) und der pH entsprach dem der Wachstumsphase.

Bis zu einer Prozesszeit von etwa 4 d stieg die Salinität mit der vorgegebenen Steigung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl. Im Anschluss wurde sie sowohl in der Wachstums- als auch in der Produktionsphase bei  $110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl konstant gehalten. Nach Erreichen der stationären Phase im Wachstumsmedium mit einer Biotrockenmassekonzentration von  $8,0 \text{ g BTM L}^{-1}$  wurde diese auf  $1 \text{ g BTM L}^{-1}$  zu Beginn der Produktionsphase verdünnt. Durch das verwendete limitierte „BG11 Produktion“-Medium wurde in der Produktionsphase nur noch wenig Wachstum beobachtet. Es wurden maximal  $2,5 \text{ g BTM L}^{-1}$  erreicht, wobei zunächst lineares Wachstum vorlag, das ab einer Prozesszeit von 25,8 d stationär blieb. Die  $\beta$ -Carotin-Konzentration betrug am Ende der stationären Phase  $24,8 \text{ mg L}^{-1}$ . Nach der Überführung der Zellen in nährstofflimitiertes Medium nahm die  $\beta$ -Carotin-Konzentration sehr stark bis  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  ab. In

den ersten drei Tagen nach der Überführung der Zellen in limitiertes Medium (16,8-18,8 d) veränderte sich die  $\beta$ -Carotin-Konzentration nicht. Im Anschluss konnte eine erhöhte Bildung von  $\beta$ -Carotin beobachtet werden. Dabei wurden nach einer Prozesszeit von 32 d maximal  $14,6 \text{ mg L}^{-1}$   $\beta$ -Carotin erreicht. Nach der Verdünnung der Zellsuspension war zunächst eine Abnahme des  $\beta$ -Carotin-Gehalts zu sehen. Der relativ konstante  $\beta$ -Carotin-Gehalt zwischen  $2,5\text{-}3,5 \text{ mg L}^{-1}$  während der Wachstumsphase konnte dann jedoch zum Ende der Produktionsphase auf  $6,0 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  gesteigert werden.

## Diskussion

In einem zweistufigen Satzprozess konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Kultivierungsbedingungen eine Verdopplung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts der Zellen möglich ist. Die zunächst nach Verdünnung der Zellsuspension auftretende Verringerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts war unerwartet. Monte *et al.* (2020) stellten fest, dass Zellen mit erhöhtem  $\beta$ -Carotin-Gehalt aufgrund ihrer höheren Anfälligkeit für Scherkräfte eine Ernte unter schonenderen Bedingungen erforderten. Diese erhöhte Schersensitivität könnte dazu geführt haben, dass gerade die Zellen mit hohem  $\beta$ -Carotin-Gehalt durch die Zentrifugation vor Überführung in die Produktionsphase geschädigt wurden und so ein Verlust an  $\beta$ -Carotin beobachtet wurde. Die Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte über eine Korrelation zwischen Trübung (optischer Dichte bei 750 nm) und Biotrockenmassekonzentration. Daher ist eine Überschätzung der Biotrockenmassekonzentration als Grund für den Abfall des  $\beta$ -Carotin-Gehalts auszuschließen. Als Ursache könnte zudem ein Abbau des  $\beta$ -Carotins in den Zellen nach Zentrifugation und Resuspendieren in limitiertes Medium sein. Um dies mit Bestimmtheit zu bestätigen, müsste jedoch direkt nach Resuspendieren eine  $\beta$ -Carotin-Messung durchgeführt werden.

Durch eine Verringerung der Biotrockenmassekonzentration in der Zellsuspension bei gleichbleibender Eingangspotonenflussdichte wurde eine Erhöhung der Lichtverfügbarkeit angestrebt. Zwar wurde bereits vorher gezeigt, dass eine geringe Lichtverfügbarkeit nicht allein für die Verringerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts in *D. salina* CCAP19/18 verantwortlich ist, allerdings wurde ab einer Biotrockenmassekonzentration von  $3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  keine weitere Steigerung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts beobachtet (vgl. Kapitel 5.6). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass mit *D. salina* bei erhöhter Lichtverfügbarkeit ( $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ein Anstieg der  $\beta$ -Carotin-Produktion erreicht werden kann (Lamers *et al.*, 2010). Die maximale Eingangspotonenflussdichte der hier gezeigten Ergebnisse lag somit über der Lichtstärke, die bei konstanter Bestrahlung eine Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration auslöste. Allerdings variierte die Eingangspotonenflussdichte bei den hier verwendeten Lichtbedingungen des 15. Juni 2012 (Almería, Spanien) stark über den Tagesverlauf. Möglicherweise reichte eine kurzfristige Überschreitung der kritischen Lichtverfügbarkeit nicht aus, sondern eine dauerhafte Erhöhung wäre notwendig. Zusätzlich zum Einfluss des Lichts sind verschiedene Nährstofflimitierungen bekannt, die

eine Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration unterstützen. Dazu zählen Stickstoff-, Phosphat-, Schwefel-, Eisen- und Manganlimitierungen (Lamers *et al.*, 2012; Marín *et al.*, 1998; Morowvat & Ghasemi, 2016; Shaker *et al.*, 2017).

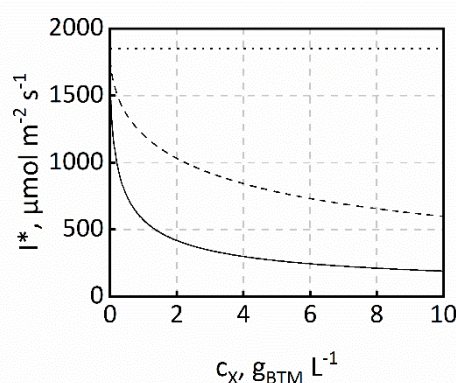
Aus dem hier durchgeführten Satzprozess lässt sich schließen, dass eine Kombination aus Phosphatlimitierung, Nitratlimitierung und/oder erhöhter Lichtverfügbarkeit eine Verdopplung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts in *D. salina* CCAP19/18 nach sich zieht. Um bestätigen zu können, welche Kombination an Nährstofflimitierung und Lichtstress am besten für die Produktion von  $\beta$ -Carotin geeignet ist, müssten allerdings weitere Versuche mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt werden.

## 6 Untersuchungen mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren

Die Herstellung von *D. salina* findet im technischen Maßstab üblicherweise in Teichen oder *Raceway Ponds* statt. Da in dieser Art von Photobioreaktor hohe Schichtdicken und damit verbunden niedrige Lichtverfügbarkeiten vorliegen, ist die erreichbare Biotrockenmassekonzentration stark eingeschränkt. Flachgerinnereaktoren können durch ihre geringere Schichtdicke von 0,6 cm höhere mittlere integrale Photonenflussdichten begünstigen und stellen daher eine Alternative zu den bisher verwendeten Photobioreaktoren dar. Um deren Eignung für die Herstellung von *D. salina* zu untersuchen, werden im Folgenden Satzprozesse mit dem zuvor ausgewählten Stamm *D. salina* CCAP19/18 beschrieben.

### 6.1 Satzprozesse in Flachgerinnereaktoren

Um zu überprüfen, ob *D. salina* CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren Wachstum aufweist, wurden vergleichende Satzprozesse in Flachplatten-Photobioreaktoren und Flachgerinnereaktoren durchgeführt. Die Satzprozesse fanden bei einer Salinität von 75 g L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7,5 und dem Temperaturverlauf des 15. Juni 2012 in Almería (Spanien) mit „BG11 2N 2P“-Medium statt (vgl. Tabelle 4.1). Durch die geringere Schichtdicke von 0,6 cm der Flachgerinnereaktoren liegt in diesem Reaktortyp bei gleicher Biotrockenmassekonzentration eine höhere Lichtverfügbarkeit vor als in Flachplatten-Photobioreaktoren (Schichtdicke: 2 cm). Gilt für *D. salina* CCAP19/18 in beiden Reaktoren das gleiche Lichtabschwächungsmodell nach Havel (vgl. Gleichung 3.17) mit demselben spezifischen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 1,54 \pm 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$ , Abbildung 5.15), zeigt die mittlere integrale Photonenflussdichte  $I^*$  zur Mittagszeit bei der höchsten Eingangspotonenflussdichte ( $I_0 = 1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) die in Abbildung 6.1 dargestellte Abhängigkeit von der Biotrockenmassekonzentration.



**Abbildung 6.1:** Mittlere integrale Photonenflussdichte in Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration von *D. salina* CCAP19/18 bei der zur Mittagszeit (15. Juni 2012, Almería, Spanien) maximal auftretenden Eingangspotonenflussdichte von 1850  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (gepunktete Linie) in Flachplatten-Photobioreaktoren mit einer Schichtdicke von 2 cm (durchgezogene Linie) und Flachgerinnereaktoren mit einer Schichtdicke von 0,6 cm (gestrichelte Linie). Zur Berechnung wurde das Lichtabschwächungsmodell nach Havel (Gleichung 3.17) mit dem spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 1,54 \pm 0,03 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$  (Abbildung 5.15) verwendet.

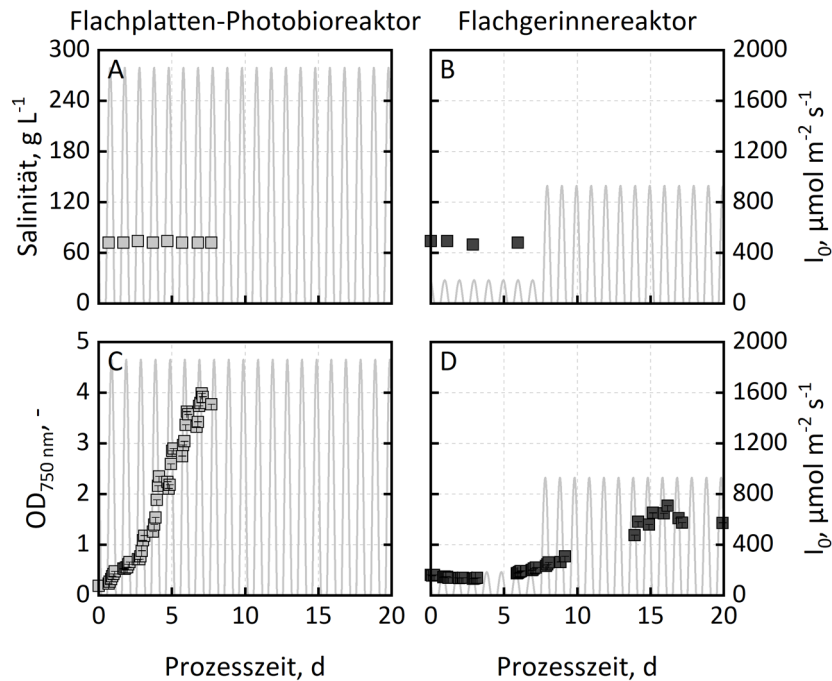
Daraus wird ersichtlich, dass bei einer Eingangsphotonenflussdichte von  $1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die Lichtverfügbarkeit im Flachgerinnereaktor bei Biotrockenmassekonzentrationen zwischen  $1\text{-}2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bis zu mehr als doppelt so hoch ist wie in Flachplatten-Photobioreaktoren. Um eine Lichtinhibierung der Zellen zu Beginn des Satzprozesses in Flachgerinnereaktoren zu verhindern, wurde die Eingangsphotonenflussdichte daher reduziert.

Der Vergleich der Wachstumskurven von *D. salina* CCAP19/18 sowie der Verläufe der Salinität ist in Abbildung 6.2 zusammengefasst. Da keine Korrelationen zwischen Biotrockenmassekonzentration und optischer Dichte bei den Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren vorlagen, werden im Folgenden die Verläufe der optischen Dichte bei 750 nm als Vergleich herangezogen. Zur Berechnung der im Flachgerinnereaktor vorliegenden mittleren integralen Photonendichte wurde der nach Gleichung 4.14 bestimmte Korrelationsfaktor von optischer Dichte bei 750 nm und Biotrockenmassekonzentration ( $f_X = 0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ ) in Flachplatten-Photobioreaktoren bei den gleichen Prozessbedingungen verwendet. Dies ist als Annäherung zu verstehen, die zur Vermeidung von Lichtinhibierung während der Satzprozesse geeignet ist. In beiden Satzprozessen blieb die Salinität konstant bei den vorgegebenen  $75 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ .

Die Wachstumskurve des Satzprozesses im Flachplatten-Photobioreaktor wies Wachstum ohne anfängliche Verzögerungsphase auf. Die exponentielle Wachstumsphase endete nach einer Prozesszeit von 3,5 d. Nach 6,4 d des anschließenden linearen Wachstums wurde eine maximale optische Dichte  $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$  von 3,9 erreicht.

Um eine Lichtinhibierung der Zellen zu Beginn des Satzprozesses im Pilotmaßstab zu verhindern, wurde die Eingangsphotonenflussdichte in den ersten sieben Tagen auf 10 % der ursprünglichen Klimadaten reduziert und lag bei einem Maximum von  $185 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die so bei einer Schichtdicke von 0,6 cm und einer Biotrockenmassekonzentration von  $0,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  zur Mittagszeit erreichte, maximale mittlere integrale Photonendichte von  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  schließt eine Inhibierung durch Licht aus. Verglichen mit dem Satzprozess im Flachplatten-Photobioreaktor wies die Wachstumskurve von *D. salina* CCAP19/18 im Flachgerinnereaktor eine sehr lange Verzögerungsphase von 5 d auf. Aufgrund der niedrigen mittleren integralen Photonendichte wäre langsames Wachstum zu erwarten. Die Stagnation bzw. leichte Abnahme der optischen Dichte  $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$  von 0,4 auf 0,3 ist dadurch allerdings nicht erklärbar. Nachdem im Anschluss an die Verzögerungsphase eine Steigerung der optischen Dichte  $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$  auf 0,65 beobachtet werden konnte, wurde die Eingangsphotonenflussdichte auf 50 % des Lichtverlaufs von Almería (Spanien) erhöht. Die maximal zur Mittagszeit erreichte mittlere integrale Photonendichte betrug bei der Eingangsphotonenflussdichte von  $930 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer Biotrockenmassekonzentration von  $0,39 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  bei der auftretenden Schichtdicke von 0,6 cm etwa  $710 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Auch bei dieser Photonendichte wurde im Flachplatten-Photobioreaktor

Wachstum beobachtet, so dass eine Lichtinhibierung ausgeschlossen wurde. Die Wachstumsphase dauerte bis zu einer Prozesszeit von 9,4 d an. Danach wurde nur noch leichtes Wachstum beobachtet, bis nach einer Prozesszeit von 15 d eine maximale optische Dichte  $OD_{750\text{ nm}}$  von 1,8 erreicht wurde.



**Abbildung 6.2:** Verlauf der Salinität (A, B) und der optischen Dichte bei 750 nm (C, D) in Satzprozessen im Flachplatten-Photobioreaktor (hellgrau) sowie im Flachgerinnereaktor (dunkelgrau) mit *D. salina* CCAP19/18 über die Prozesszeit. Die Durchführung der Satzprozesse erfolgte bei pH 7,5, einer Salinität von 75  $\text{g L}^{-1}$  NaCl und Temperaturverlauf aus Almería (Spanien) mit „BG11 2N 2P“-Medium. Die Eingangsphotonenflussdichte im Satzprozess im Flachgerinnereaktor lag zwischen 10-50 % der in Almería gemessenen Eingangsphotonenflussdichte, die im Flachplatten-Photobioreaktor angewendet wurde.

## Diskussion

Mit dem im Flachgerinnereaktor durchgeführten Satzprozess konnte gezeigt werden, dass Wachstum von *D. salina* CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren möglich ist, wenn die Photonenflussdichte geringgehalten wird. Bereits in vorher am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München bearbeiteten Fragestellungen wurde gezeigt, dass verschiedene Algenstämme in diesem Reaktortyp produziert werden können (Apel, 2017; Koller, 2017; Pfaffinger, 2017). Entgegen der Ergebnisse mit *Nannochloropsis salina* (Apel, 2017; Pfaffinger, 2017) wurde jedoch eine deutlich längere Verzögerungsphase des Wachstums zu Beginn der Prozesse beobachtet. Zusätzlich wurden geringere optische Dichten erreicht als in Flachplatten-Photobioreaktoren. Aufgrund der starken Unterschiede in Aufbau, Betrieb und Geometrie der Flachgerinnereaktoren zu den Flachplatten-Photobioreaktoren können verschiedene Faktoren einen negativen Einfluss auf das Wachstum haben. Ein Vergleich der unterschiedlichen geometrischen Eigenschaften und des volumetrischen Leistungseintrags ist in Tabelle 6.1 dargestellt. Der volumetrische Leistungseintrag wurde nach



Gleichung 3.1 unter Vernachlässigung der Blasenbildung berechnet. Bei einer Salinität von  $75 \text{ g L}^{-1}$  im Medium lag der volumetrische Leistungseintrag somit bei etwa  $80 \text{ W m}^{-3}$ . Die Berechnung des volumetrischen Leistungseintrags des Flachgerinnereaktors ( $V = 65 \text{ L}$ ) erfolgte mit Gleichung 3.2. Der Volumenstrom betrug  $2,4 \text{ L s}^{-1}$ , die Höhendifferenz  $1,4 \text{ m}$  und die Dichte entsprach der von  $75 \text{ g L}^{-1}$  Salzlösung.

**Tabelle 6.1:** Vergleich der geometrischen Eigenschaften sowie des volumetrischen Leistungseintrags (Berechnung nach Gleichungen 3.1-3.2) der verwendeten Flachplatten-Photobioreaktoren und der eingesetzten Flachgerinnereaktoren.

| Eigenschaften                          | Flachplatten-Photobioreaktor | Flachgerinnereaktor   |
|--|------------------------------|-----------------------|
| <i>Geometrie:</i>                      |                              |                       |
| Schichtdicke                           | 2 cm                         | 0,6 cm                |
| photosynthetisch aktive Fläche         | 0,09 m <sup>2</sup>          | 8 m <sup>2</sup>      |
| Arbeitsvolumen                         | 1,8 L                        | 65 L                  |
| Oberfläche/Volumen-Verhältnis          | 50 m <sup>-1</sup>           | 120 m <sup>-1</sup>   |
| <i>Volumetrischer Leistungseintrag</i> | 80 W m <sup>-3</sup>         | 530 W m <sup>-3</sup> |

Einerseits liegt durch die verringerte Schichtdicke von 0,6 cm im Flachgerinnereaktor eine höhere Lichtverfügbarkeit für die Zellen vor. Aus der höchsten, zur Mittagszeit vorliegenden Eingangsphotonenflussdichte von  $1850 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , einem Extinktionskoeffizienten von  $1,54 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-0,5} \text{ L}^{0,5}$  (vgl. Kapitel 5.6) und einer minimalen Biotrockenmassekonzentration von  $0,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  ließ sich die maximal auf die Zellen wirkende mittlere Photonendichte errechnen. Bei der um die Mittagszeit auftretenden, maximalen Eingangsphotonenflussdichte würde die im Flachplatten-Photobioreaktor vorliegende mittlere Photonendichte von  $870 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  im Flachgerinnereaktor um über 60 % auf  $1430 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gesteigert. Um die Zellen im Flachgerinnereaktor zunächst vor Lichtinhibierung zu schützen und diese als Grund für die lange Verzögerungszeit auszuschließen, wurde die Eingangsphotonenflussdichte jedoch zu Beginn des Satzprozesses auf 10 % reduziert. Hieraus ergab sich maximal eine mittlere Photonendichte von etwa  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Eine Lichtinhibierung konnte also als Ursache für die lange Verzögerungsphase ausgeschlossen werden, da die mittlere Photonendichte deutlich unter der im Flachplatten-Photobioreaktor lag.

Ein weiterer Unterschied war die Anheftung der Zellen, die im Gegensatz zu den Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren an den Gerinnen der Flachgerinnereaktoren beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung könnte das vom Flachplatten-Photobioreaktor abweichende Material sein. Im Gegensatz zu den Glasscheiben und der Edelstahlkammer der Flachplatten-Photobioreaktoren besteht die Oberfläche des Flachgerinnereaktors aus Polyethylen. Zur Ermittlung der Gesamtbiomasse wurde versucht, die Zellen manuell vom Gerinne zu lösen, wobei eine mechanische Schädigung der Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte. Zusätzlich führen Biofilme zu Limitierungen des Lichts oder der

Nährstoffverfügbarkeit durch verschlechterte Transportvorgänge, als deren Folge die maximal erreichbare optische Dichte limitiert sein könnte.

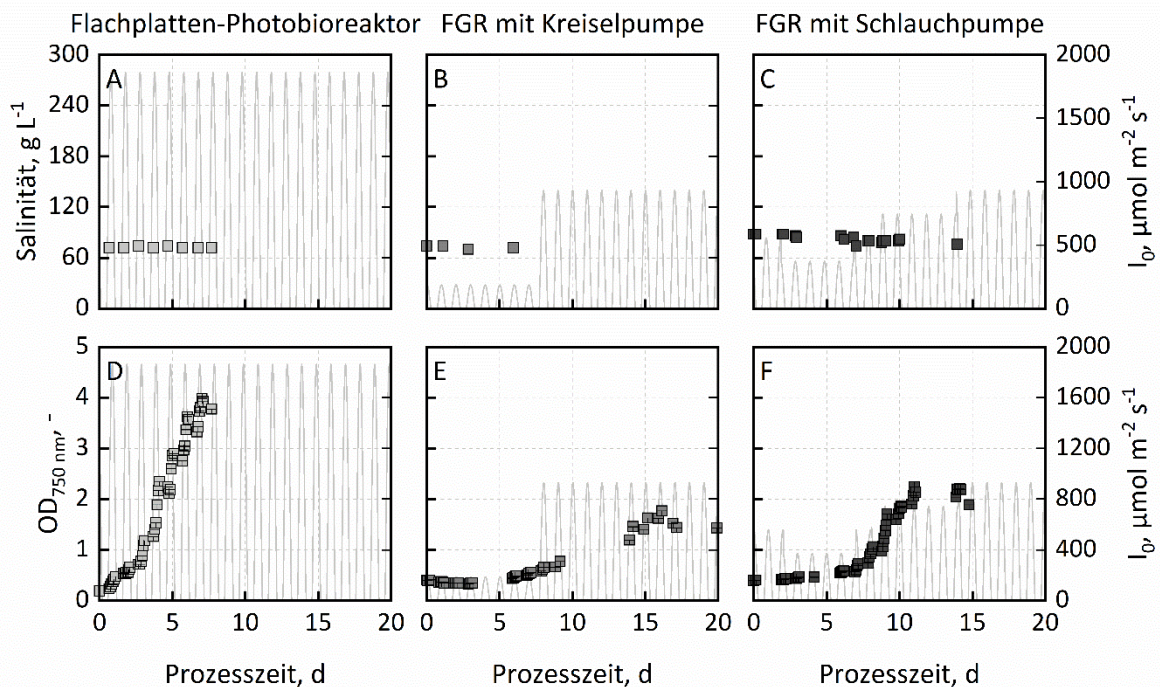
Neben diesen material- und geometriebezogenen Unterschieden könnte auch der fast siebenfach höhere volumetrische Leistungseintrag höhere Scherkräfte hervorrufen und Einfluss auf die Kultivierung nehmen. Es ist bekannt, dass verschiedene Mikroalgenstämme bei Einsatz einer Kreiselpumpe aufgrund hoher wirkender Scherkräfte kein Wachstum aufweisen (Michels *et al.*, 2016). Bei den untersuchten schersensitiven Mikroalgenstämmen konnte bereits bei Scherspannungen zwischen 2-20 Pa in einem Rotationsrheometer mit Scherzylinder eine deutliche Abnahme der Viabilität beobachtet werden. Der einzige Stamm, der Wachstum in einem Rohrreaktor mit Kreiselpumpe aufwies, war *Tetraselmis suecica* und tolerierte Scherspannungen bis mindestens 100 Pa (Michels *et al.*, 2016). Für *D. salina* wurde von Kokkinos *et al.* (2016) eine kritische Scherspannung von 18 Pa in einem Platte-Platte-Rheometer ermittelt, ab der eine Abnahme intakter Zellen beobachtet werden konnte (Kokkinos *et al.*, 2016). Auch die fehlende Zellwand von *D. salina* stützt diese Beobachtung (Borowitzka & Siva, 2007; Oliveira *et al.*, 1980). Der Einsatz einer Kreiselpumpe zur Förderung der Algensuspension im Flachgerinnereaktor könnte daher die Ursache für das reduzierte Wachstum in Flachgerinnereaktoren sein.

## 6.2 Satzprozesse mit verschiedenen Pumpentypen

Um dies zu untersuchen wurde die Kreiselpumpe durch eine Schlauchpumpe ersetzt. Bei der Förderung mit einer Kreiselpumpe kommen sich bewegende Kanten der Laufradschaufeln mit der Algensuspension in Berührung. An diesen Kanten tritt die maximale lokale Energiedissipation im Inneren der Kreiselpumpe auf. Die so entstehende höhere lokale Energiedissipation kann zur Schädigung von Zellen führen. Bei einer Schlauchpumpe wird der Schlauch, durch den die Algensuspension gefördert wird, durch Rollen abgeklemmt. Die durch Bewegung der Rollen stattfindende Förderung kann so scherärmer stattfinden. Die gewählten Prozessbedingungen wurden mit einer Salinität von 75 g L<sup>-1</sup>, pH 7,5 und der Tag-Nacht-Dynamik von Temperatur und Licht aus Almería (Spanien) beibehalten. Im Satzprozess mit Kreiselpumpe wurde die Zellsuspension mit 2,4 L s<sup>-1</sup> gefördert, wobei eine Schichtdicke von 0,6 cm entstand. Durch starkes Pulsieren beim Einsatz der Schlauchpumpe musste der Volumenstrom auf 1,7 L s<sup>-1</sup> reduziert werden, wodurch die Schichtdicke auf 0,5 cm und der Leistungseintrag auf 380 W m<sup>-3</sup> verringert wurde. Der Verlauf von Salinität und optischer Dichte unter Verwendung beider Pumpentypen ist in Abbildung 6.3 zusammengefasst.

In beiden zu vergleichenden Satzprozessen blieb die Salinität konstant bei 75 g L<sup>-1</sup> NaCl. Im Satzprozess mit Kreiselpumpe lag die Photonenflussdichte in den ersten sieben Tagen bei maximal 185 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, ab Tag 8 bei bis zu 930 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Während der ersten zwei Tage des Satzprozesses mit Schlauchpumpe lag die maximale Photonenflussdichte zu Beginn bei maximal 560 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Zwischen Tag 3-6 wurde sie auf  $370 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gesenkt und im Anschluss graduell gesteigert, bis zum Ende ebenfalls maximal  $930 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf die Zellsuspension trafen. Die mittlere integrale Photonenflussdichte bei der über den Tagesverlauf zur Mittagszeit höchsten vorliegenden Eingangspotonenflussdichte lag zwischen  $300\text{-}620 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und war somit in einem Bereich, in dem in Flachplatten-Photobioreaktoren Wachstum beobachtet wurde. So konnte auch im Satzprozess mit Schlauchpumpe die Lichtverfügbarkeit als Ursache der beobachteten, fünftägigen Verzögerungsphase ausgeschlossen werden. Das Wachstum während der exponentiellen Wachstumsphase des Satzprozesses mit Schlauchpumpe war jedoch höher, sodass bereits nach einer Prozesszeit von 11 d eine optische Dichte  $OD_{750 \text{ nm}}$  von 2,2 gemessen werden konnte. Im Vergleich zu dem Satzprozess mit Kreiselpumpe konnte durch den Austausch der Pumpe und die Reduktion des volumetrischen Leistungseintrages um 30 % eine Steigerung der maximal erreichten optischen Dichte um 22 % erreicht werden.



**Abbildung 6.3:** Zeitlicher Verlauf der Salinität (A-C) und der optischen Dichte bei 750 nm (D-F) in Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren (hellgrau) sowie in Flachgerinnereaktoren (FGR) mit Kreiselpumpe (grau) und mit Schlauchpumpe (dunkelgrau) mit *D. salina* CCAP19/18. Die Durchführung der Satzprozesse erfolgte bei pH 7,5, einer Salinität von  $75 \text{ g L}^{-1}$  NaCl und einem Temperaturverlauf aus Almería (Spanien) mit „BG11 2N 2P“-Medium. Die Eingangspotonenflussdichte im Satzprozess mit Kreiselpumpe lag zwischen 10-50 % der in Almería gemessenen Eingangspotonenflussdichte, im Satzprozess mit Schlauchpumpe lag diese zwischen 20-50 %.

## Diskussion

Durch Austausch der Kreiselpumpe mit einer Schlauchpumpe sowie der Reduktion des Leistungseintrags aufgrund einer notwendigen Verringerung des Volumenstroms konnte gezeigt werden, dass ein höheres Wachstum mit einer gesteigerten maximalen optischen Dichte von *D. salina* CCAP19/18

in Flachgerinnereaktoren möglich war. Auch für *Tetraselmis suecica* konnte ein Einfluss des Pumpentyps auf die Zellen beobachtet werden. Bei Förderung mit einer Schlauchpumpe wurde hier ein deutlich geringerer Verlust der Motilität der Zellen verglichen mit einer Kreiselpumpe beobachtet. (Jaouen *et al.*, 1999).

In den Satzprozessen mit Kreiselpumpe und Schlauchpumpe mit *D. salina* CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren wurde die maximale mittlere integrale Photonenflussdichte  $I^*$  über den Tagesverlauf zur Mittagszeit bei jeweils vorliegenden maximalen integralen Photonenflussdichten zwischen 150-710  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gehalten. In diesem Bereich findet auch im Flachplatten-Photobioreaktor statt. Durch Abweichungen der mittleren integralen Photonenflussdichte zur Mittagszeit ist es wahrscheinlich, dass die Wachstumsraten in den verschiedenen Satzprozessen nicht vergleichbar sind. Die maximale erreichte optische Dichte  $OD_{750 \text{ nm}}$  bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Die Erhöhung der optischen Dichte um 22 % kann also auf den Austausch der Pumpe und/oder die Reduktion des volumetrischen Leistungseintrags zurückzuführen sein.

Die Reduktion des Volumenstroms verringert den Betrag der maximalen lokalen Energiedissipation. Darüber hinaus hängt der Einfluss auf das Wachstum neben dem Betrag der maximalen lokalen Energiedissipation auch von der Einwirkdauer ab (Gregoriades *et al.*, 2000; Mollet *et al.*, 2004). Bezogen auf die Gesamtdauer von 28 s (Severin *et al.*, 2017). Im Vergleich zu der Zeit, die eine Algenzelle im Schnitt braucht, um den Flachgerinnereaktor einmal zu durchströmen, ist die Aufenthaltszeit in der Pumpe sehr niedrig. Da allerdings keine Angaben der Hersteller zur maximalen lokalen Energiedissipation verfügbar waren, ist eine abschließende Beurteilung des Austauschs der Kreiselpumpe durch eine Schlauchpumpe nicht möglich.

Auch außerhalb der Pumpe kann gerade bei Veränderungen des durchströmten Durchmessers eine hohe lokale Energiedissipation auftreten. Durch Austausch der Kreiselpumpe, deren Austrittsöffnung (3 cm) auf den Rohrleitungsdurchmesser (4,8 cm) erweitert wird, mit einer Schlauchpumpe wurde die Erweiterung des Durchmessers vermieden (Schlauchinnendurchmesser: 5 cm). Allerdings kommt es bei Durchströmung eines Volumenstromsensors zusätzlich zunächst zu einer Verringerung des Durchmessers und bei Austritt zu einer Erhöhung von 2 cm auf 5 cm. Möglicherweise kann es hier ebenfalls zu hoher lokaler Energiedissipation kommen. Auch zwischen Zulauf und Einlaufbecken kommt es zu einer starken Veränderung. Hier tritt die Algensuspension aus einem Rohr (Innendurchmesser: 5 cm) in das Einlaufbecken ein. Teile des Einlaufs im Becken weisen keine Neigung auf, sodass Kavitation an der auftretenden Kante begünstigt werden kann. Außerdem trifft die Algensuspension auf einen über der Öffnung waagrecht zum Volumenstrom angebrachten Strömungsbrecher auf. Stellenweise tritt durch hohe Turbulenzen eine Tröpfchenbildung von

Algensuspension auf. Gerade bei der Zerstörung von dünnen Flüssigkeitsfilmen wie bei Gasblasen an der Flüssigkeitsoberfläche, in denen sich Zellen befinden, treten Zellschädigungen auf (Marks, 2003).

Eine Möglichkeit, die auf die Algen wirkenden Scherspannungen zu reduzieren, ist die Zugabe scherprotektiver Agenzien. Die Polaxamer-Mischung Pluronic F-68 ist ein nicht-ionischer oberflächenaktiver Stoff, der bei der Kultivierung von Zellkulturen durch die Verringerung von Zellen in den Filmen von Gasblasen negative Effekte beim Platzen der Gasblasen verringert (Heath & Kiss, 2007). Zusätzlich führte die Zugabe von Pluronic F-68 aber auch in einer Gasblasen-freien Umgebung zum Schutz vor Schädigungen durch Scherspannungen. Dieser zweite Effekt ist vermutlich auf die Anlagerung von Pluronic F-68 an die Zellen zu führen, was zu einem Schutz führen kann (Tharmalingam *et al.*, 2008). Auch Carboxymethylcellulose ist dafür bekannt, den Einfluss von Scherspannungen auf Mikroalgen sowohl bei Gasblasenbildung als auch bei Leistungseintrag durch Schütteln zu verringern (Camacho *et al.*, 2001; Gallardo Rodríguez *et al.*, 2011).

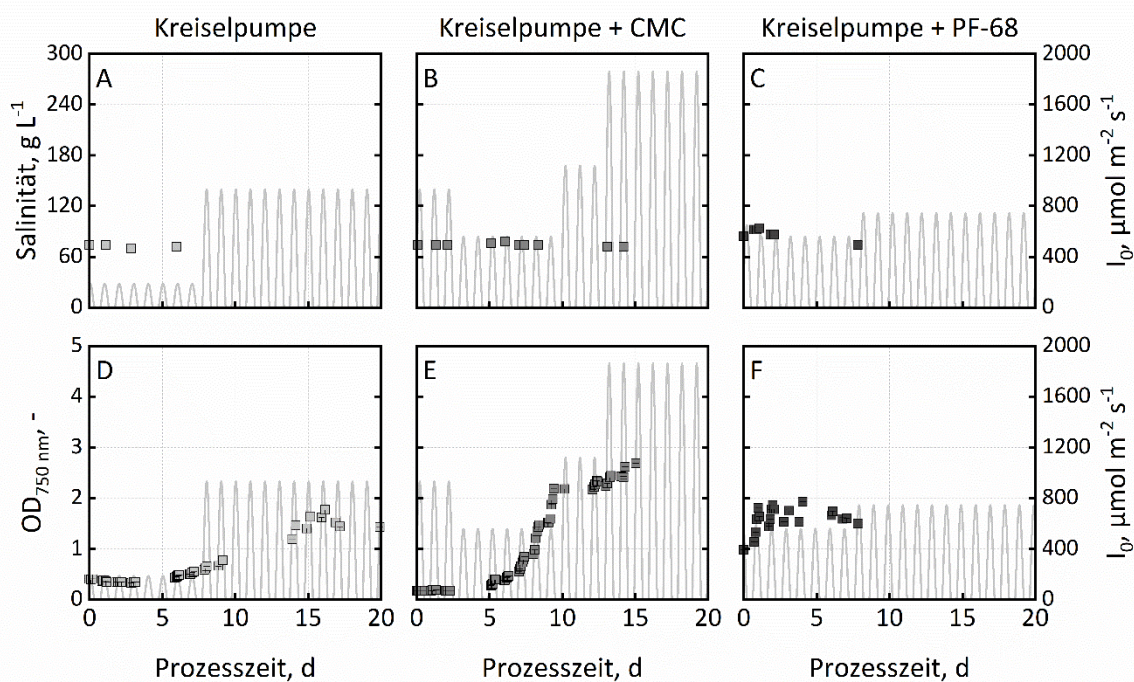
### 6.3 Satzprozesse bei Zugabe scherprotektiver Agenzien

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Kombinationen aus Pumpe und scherprotektivem Zusatzstoff zu einer verbesserten Produktion von *D. salina* CCAP19/18 in Flachgerinnereaktoren führen, wurden Satzprozesse mit Kreisel- und Schlauchpumpe unter Zugabe von Carboxymethylcellulose und Pluronic F-68 bei pH 7,5, einer Salinität von 75 g L<sup>-1</sup> NaCl und mit „BG11 2N 2P“-Medium durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2.6). Die Temperatur wurde zwischen 15-30 °C gemäß dem Temperaturverlauf (Almería, Spanien) variiert.

Der Vergleich der Wachstumskurven und der Verläufe der Salinität bei Verwendung einer Kreiselpumpe und zusätzlicher Zugabe von Carboxymethylcellulose und Pluronic F-68 ist in Abbildung 6.4 zusammengefasst. Die Salinität blieb bei allen Kultivierungen konstant bei 75 g L<sup>-1</sup> NaCl. Die Eingangspotonenflussdichte betrug bei Verwendung der Kreiselpumpe ohne Zugabe eines scherprotektiven Zusatzstoffs maximal 930  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ab Tag 8. Die maximalen mittleren integralen Photonenflussdichten lagen zwischen 290-570  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dabei wurde eine maximale optische Dichte von 1,8 und eine maximale Wachstumsrate von 0,4 d<sup>-1</sup> erreicht. Die exponentielle Phase mündete nach 10-15 Tagen in lineares Wachstum. Im Satzprozess mit Kreiselpumpe und bei Zugabe von Pluronic F-68 trat aufgrund der höheren Animpfdichte eine deutlich verringerte Verzögerungsphase auf. Die maximal erreichte Wachstumsrate lag bei 1,8 d<sup>-1</sup>, hielt jedoch nur einen Tag an und endete bei einer maximal erreichten optische Dichte von 1,5. Allerdings deutete hier eine Verfärbung der Zellsuspension auf eine Veränderung der Zellen hin. Aufgrund der mittleren integralen Photonenflussdichten zwischen 360-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die bei maximalen, zur Mittagszeit auftretenden Eingangspotonenflussdichten zwischen 560-830  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ermittelt wurden, ist eine Farbänderung aufgrund des Lichteintrags

auszuschließen. Eine starke Schaumbildung bei der Zugabe von Pluronic F-68 erforderte zudem den Zusatz von Antischaummittel (vgl. Kapitel 4.2.6).

Im Satzprozess mit Kreiselpumpe und Carboxymethylcellulose lag die täglich maximal zur Mittagszeit erreichte Eingangsphotonenflussdichte zwischen  $370\text{--}1850\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ . Dabei wurden bei einer Schichtdicke von 0,6 cm maximale integrale Photonflussdichten zwischen  $480\text{--}1130\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  erreicht. Zwar lag die mit  $1130\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  erreichte mittlere integrale Photonflussdichte sehr hoch, aber auch bei dieser konnte im Flachplatten-Photobioreaktor Wachstum beobachtet werden. Die Verzögerungsphase endete nach 5 d, woraufhin das exponentielle Wachstum einsetzte. Dabei wurde eine maximale Wachstumsrate von  $1,8\ \text{d}^{-1}$  ermittelt. Die maximale optische Dichte von 2,7 entsprach einer Steigerung von etwa 60 % verglichen mit dem Satzprozess mit Kreiselpumpe ohne Zugabe scherprotektiver Agenzien. An Tag 14 des Satzprozesses mit Carboxymethylcellulose wurden aufgrund einer vermuteten Limitierung Nährstoffe zugegeben. Zusätzlich wurde die Eingangsphotonenflussdichte erhöht. Da trotzdem weiterhin nur ein linearer Anstieg des Wachstums beobachtet werden konnte, wurde der Satzprozess nach einer Prozesszeit von 16 d beendet.

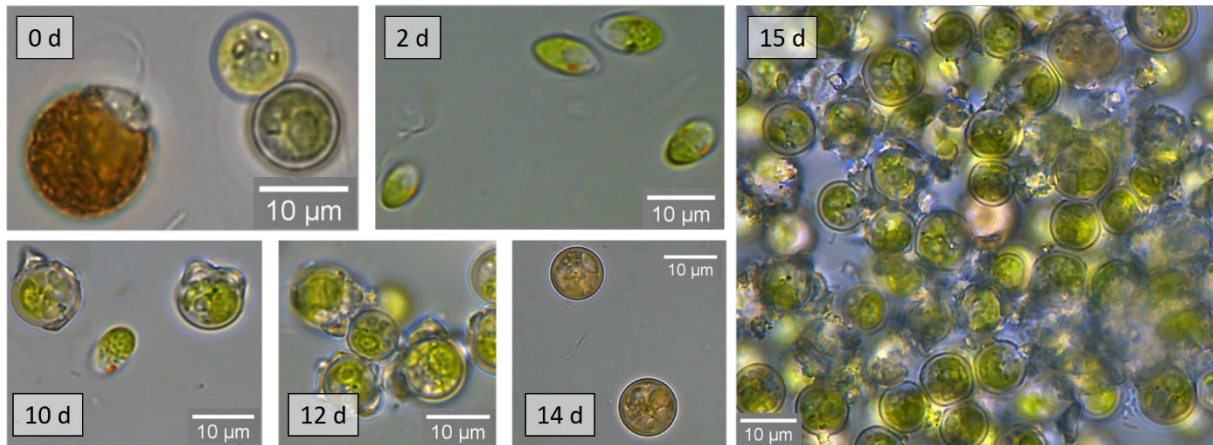


**Abbildung 6.4:** Zeitlicher Verlauf von Salinität (A-C) und optischer Dichte bei 750 nm (D-F) in Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren mit Kreiselpumpe (hellgrau) unter Zugabe von 0,02 % (w/v) Carboxymethylcellulose (CMC, grau) und 0,01 % (v/v) Pluronic F-68 (PF-68, dunkelgrau) mit *D. salina* CCAP19/18. Die Durchführung der Satzprozesse erfolgte bei pH 7,5, einer Salinität von  $75\ \text{g L}^{-1}$  NaCl und Temperaturverlauf aus Almería (Spanien) mit „BG11 2N 2P“-Medium. Die Eingangsphotonenflussdichte im Satzprozess mit Kreiselpumpe lag zwischen 10-50 % der in Almería gemessenen Eingangsphotonenflussdichte, im Satzprozess mit Carboxymethylcellulose lag diese zwischen 20-100 %, bei Zugabe von Pluronic F-68 zwischen 30-45 %.

Über die Prozesszeit konnte eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie von *D. salina* CCAP19/18 beobachtet werden (vgl. Abbildung 6.5). Zunächst waren sowohl orangefarbene als auch grüne Zellen



nach der Inokulation zu sehen. Nach einer Prozesszeit von 2 d konnten nur noch grüne, motile Zellen nachgewiesen werden. Diese bildeten nach einer Prozesszeit von 10 d Ausstülpungen. Diese veränderten Zellen lagerten sich bei weiter voranschreitender Prozesszeit zu Zellverbänden zusammen, die bis zu 200 Zellen enthielten.

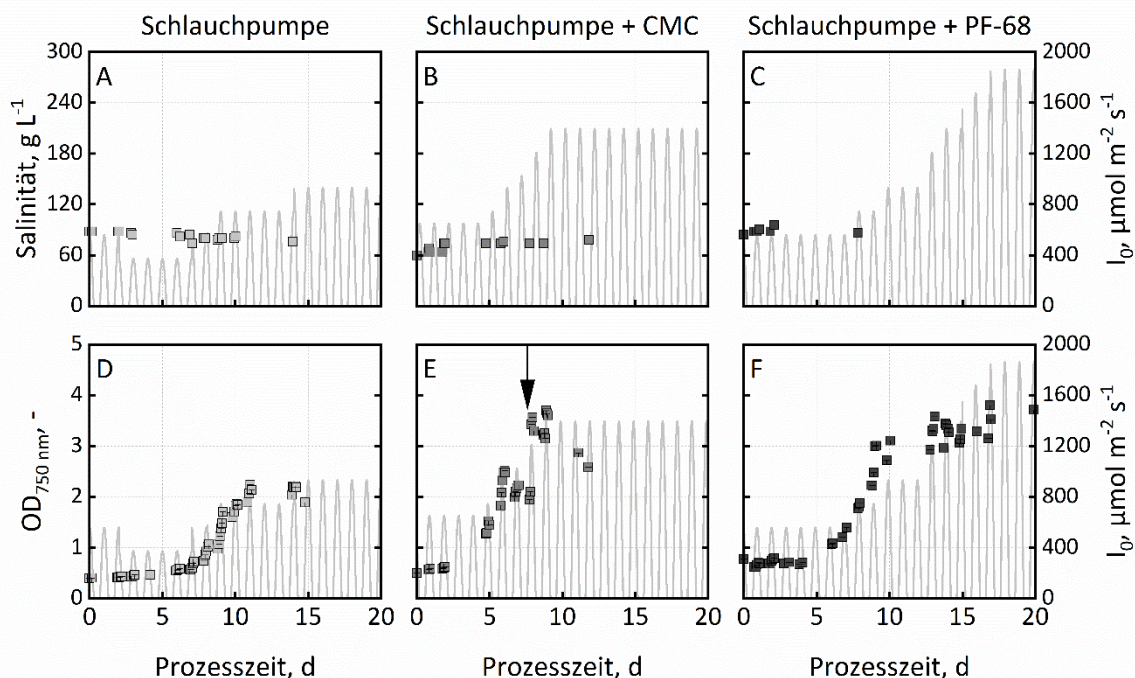


**Abbildung 6.5:** Mikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von *D. salina* CCAP19/18 im Satzprozess in Flachgerinnereaktoren mit Kreiselpumpe bei pH 7,5, 75 g L<sup>-1</sup> NaCl mit „BG11 2N 2P“-Medium mit Zusatz von 0,02 % (w/v) Carboxymethylcellulose. Die Tagesganglinien von Temperatur und Licht entsprachen Klimadaten des 15. Juni 2012 aus Almería (Spanien), wobei die Eingangspotonenflussdichte zwischen 20-100 % der Eingangspotonenflussdichte von Almería lag. Bei Inokulation (Prozesszeit: 0 d) lagen sowohl orangefarbene als auch grüne Zellen vor, nach einer Prozesszeit von 2 d wurden nur noch grüne, motile *D. salina*-Zellen nachgewiesen. Ab 10 d wurden Zellen mit Ausstülpungen beobachtet, die sich ab einer Prozesszeit von 12 d zusammenlagerten. Zusätzlich wurden ab einer Prozesszeit von 14 d orangegefärbte, runde Zellen beobachtet. Nach 15 d erreichten die bereits beschriebenen Zusammenlagerungen Zahlen von bis zu 200 Zellen.

Zum Vergleich wurden ebenfalls Satzprozesse mit Schlauchpumpe unter Zugabe von Carboxymethylcellulose und Pluronic F-68 verglichen. Deren Verläufe von Salinität und optischer Dichte sind in Abbildung 6.6 zusammengefasst. Die vorgegebene Salinität von 75 g L<sup>-1</sup> NaCl blieb in den drei Satzprozessen über die Prozesszeit konstant. Zur Vermeidung anfänglicher Lichtinhibierung der Zellen wurde die maximale Eingangspotonenflussdichte im Satzprozess mit Schlauchpumpe ohne Zugabe scherpotektiver Stoffe auf 370-930 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> reduziert. Bei Zugabe von Carboxymethylcellulose lag die maximale Lichtstärke, die zur Mittagszeit auf die Suspensionsoberfläche traf, zwischen 650-1850 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und bei Zugabe von Pluronic F-68 zwischen 560-1850 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Damit lagen die mittleren integralen Photonenflussdichten während der Mittagszeit in allen Satzprozessen mit Schlauchpumpe zwischen 300-1130 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und entsprachen Photonenflussdichten, bei denen im Flachplatten-Photobioreaktor Wachstum beobachtet wurde.

Der bereits in Kapitel 6.2 beschriebene Satzprozess ohne Zugabe von scherpotektiven Agenzien wies eine etwa fünftägige Verzögerungsphase auf, nach der exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von 1,5 d<sup>-1</sup> gemessen wurde. Die maximale optische Dichte wurde nach 12 d erreicht. Ab einer Prozesszeit von 14 d war eine Abnahme der in Lösung befindlichen Zellen zu beobachten. Zudem

fand auf den Gerinnen die Ablagerung von Zellen zu Biofilmen statt. Unter Zugabe von Carboxymethylcellulose wurde eine Verringerung der Verzögerungsphase beobachtet. Bereits nach 6 d wurde eine optische Dichte von 2,5 erreicht. Kurz darauf wurde eine starke Abnahme der Zelldichte in der Suspension aufgrund von Biofilmbildung festgestellt. Zwar wurde auch im Satzprozess im Flachgerinnereaktor mit Schlauchpumpe ohne Zugabe scherprotektiver Stoffe Biofilmbildung beobachtet, es trat jedoch keine starke Abnahme der optischen Dichte  $OD_{750\text{ nm}}$  auf. Um zu überprüfen, ob die Zellen noch wuchsen, erfolgte daher nach 8 d eine mechanische Ablösung des Biofilms. Die sprunghafte Zunahme der optischen Dichte bestätigte eine Steigerung der Biomasse im Biofilm. Zusätzlich wurden dem Satzprozess zur Vermeidung von Limitierungen Nährstoffe und zur Vermeidung von Zellanhaftung Pluronic F-68 hinzugefügt. Bis zu einer Prozesszeit von 9 d stieg die optische Dichte der Zellsuspension weiterhin an, danach wurde erneut Biofilmbildung beobachtet.



**Abbildung 6.6:** Zeitlicher Verlauf von Salinität (A-C) und optischer Dichte bei 750 nm (D-F) in Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren mit Schlauchpumpe (hellgrau) unter Zugabe von Carboxymethylcellulose (grau) und Pluronic F-68 (dunkelgrau) mit *D. salina* CCAP19/18. Die Durchführung der Satzprozesse erfolgte bei pH 7,5, einer Salinität von  $75\text{ g L}^{-1}$  NaCl und Temperaturverlauf aus Almería (Spanien) mit „BG11 2N 2P“-Medium. Die Eingangspotonenflussdichte im Satzprozess mit Schlauchpumpe lag zwischen 20-50 % der in Almería gemessenen Eingangspotonenflussdichte, im Satzprozess bei Zugabe von Carboxymethylcellulose zwischen 35-75 % und mit Pluronic F-68 zwischen 30-100 %. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem eine manuelle Ablösung von Zellen von den Gerinnen erfolgte.

Die Verzögerungsphase im Satzprozess mit Pluronic F-68 betrug wie in den Prozessen mit Kreiselpumpe etwa 5 d, obwohl das Inokulum einem zuvor betriebenen Flachgerinnereaktor entnommen wurde. Die maximale Wachstumsrate in der exponentiellen Wachstumsphase betrug  $1,4\text{ d}^{-1}$ , die vor der Zugabe weiterer Nährstoffe erreichte optische Dichte 3,3. An Tag 13 wurde in diesem Prozess eine



Nährstoffzugabe durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine weitere Erhöhung der optischen Dichte stattfindet. Es konnte nur noch eine leichte Steigerung der optischen Dichte von 3,3 auf 3,7 beobachtet werden. Bei Zugabe von Pluronic F-68 traten weder Zellanhaftungen am Reaktorgerinne noch Veränderungen in der Zellmorphologie wie in Abbildung 6.5 auf.

### Diskussion

Durch die Zugabe scherprotektiver Agenzien wie Carboxymethylcellulose oder Pluronic F-68 wurde in Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren mit *D. salina* CCAP19/18 gezeigt, dass die in Suspension befindliche Zellmasse gesteigert werden konnte. Bei der Polaxamer-Mischung Pluronic F-68 handelt es sich um nicht-ionische, oberflächenaktive Tenside, deren Zugabe laut Herstellerangaben auf Zellen wirkende Scherspannungen in Suspensionskulturen reduzieren kann, die Schaumbildung verringert und die Anhaftung von Zellen an Oberflächen wie Glas reduziert. Die verringerte Zellanhaftung konnte in dieser Arbeit ebenfalls für die Gerinne aus Polyethylen beobachtet werden. Pluronic F-68 schützte den Stamm *Protoceratium reticulatum* besser gegen Scherkräfte als Carboxymethylcellulose (Gallardo Rodríguez *et al.*, 2011). Carboxymethylcellulose bewirkte bei *Phaeodactylum tricornutum* keine physiologischen Veränderungen und schützte die Zellen somit rein physikalisch (Camacho *et al.*, 2001). Auch der Scherspannungen senkende Effekt von Carboxymethylcellulose auf *D. salina* wurde bereits in begasten Photobioreaktoren beobachtet (Silva *et al.*, 1987). Tatsächlich wurde durch die Zugabe von Carboxymethylcellulose in Kombination mit der Schlauchpumpe eine leichte Verringerung der Verzögerungsphase gegenüber Satzprozessen ohne Zugabe von Carboxymethylcellulose mit Kreiselpumpe erzielt. Beim Referenzversuch mit Schlauchpumpe ohne Zusatzstoffe sowie bei der Verwendung von Carboxymethylcellulose mit der Kreiselpumpe lag die Verzögerungsphase jedoch weiterhin bei 5 Tagen. Auch die Zugabe von Pluronic F-68 verringerte die Verzögerungsphase nicht. Allerdings schien die Zugabe von Carboxymethylcellulose im Satzprozess mit Schlauchpumpe die Anheftung der Zellen an das Gerinne zu unterstützen.

Da das Wachstum in Flachgerinnereaktoren trotz der Modifikationen weiterhin niedriger lag als das Wachstum in Flachplatten-Photobioreaktoren, ist es denkbar, dass nicht die Scherkräfte allein für die lange Verzögerungsphase verantwortlich sind. Weitere, nicht näher untersuchte Unterschiede von Flachplatten-Photobioreaktor und Flachgerinnereaktor liegen in der pH-Regelung, die im Flachgerinnereaktor nur im Sammelbecken stattfindet. Über die Gerinne hinweg besteht also die Möglichkeit zur Bildung von pH-Gradienten. Durch die bereits gezeigte pH-Toleranz (vgl. Kapitel 5.2) ist diese Ursache allerdings unwahrscheinlich. Die Verzögerungsphase von 5 d wurde zudem sowohl bei Satzprozessen mit Inokulum aus den Flachplatten-Photobioreaktoren als auch mit Inokulum aus einem Flachgerinnereaktor beobachtet. Die Zellen aus dem Flachgerinnereaktor sollten bereits an den Reaktor angepasst sein, weswegen die lange Adaptionsphase unerwartet war.

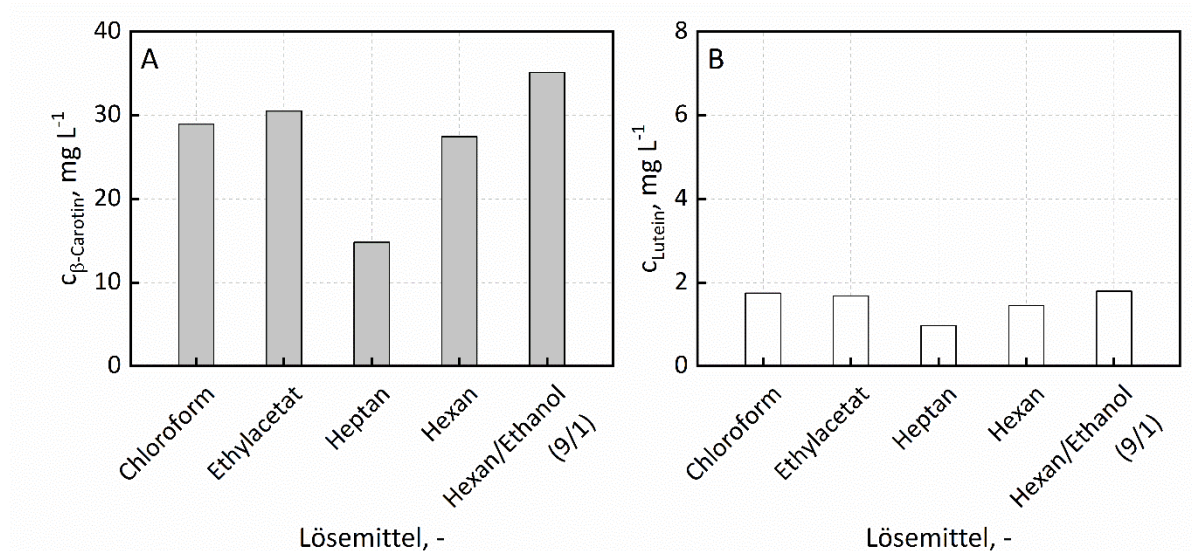
Die maximal erreichte optische Dichte ohne Zugabe weiterer Nährstoffe und Zellablösung vom Gerinne wurde im Satzprozess mit Schlauchpumpe unter Zugabe von Pluronic F-68 erzielt. Mit 3,3 lag sie nach 13 d nur knapp unter der im Labormaßstab nach einer Prozesszeit von 6,4 d erreichten Zelldichte von 3,9. Die Prozesszeit wurde allerdings durch die lange Verzögerungsphase verdoppelt. Wird vorausgesetzt, dass die Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmassekonzentration im Pilotmaßstab etwa der im Labormaßstab entspricht (Korrelationsfaktor:  $0,6 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , vgl. Gleichung 4.14), wurden maximal  $2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht. Verglichen mit bisher veröffentlichten Biotrockenmassekonzentrationen von  $0,33\text{-}1,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  entspricht dies einer Steigerung um 67-570 % (Borovkov *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). Die  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen lagen in allen Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren unter  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Ergebnisse nicht gezeigt) und damit deutlich geringer als die in der Literatur ermittelten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen von  $19\text{-}20 \text{ mg L}^{-1}$  (Borovkov *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). Das ist möglicherweise auf die mit *D. salina* CCAP19/18 erreichten geringen  $\beta$ -Carotin-Gehalte und auf die Prozessbedingungen zurückzuführen. Darüber hinaus sind Zellen mit intrazellulär angereichertem  $\beta$ -Carotin schereempfindlicher, was zu einem Verlust führen kann (Monte *et al.*, 2020). Da zudem in Flachgerinnereaktoren mit anderen Mikroalgenstämmen bereits Biotrockenmassekonzentration bis zu  $50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erzielt werden konnten (Apel *et al.*, 2017) und *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Photobioreaktoren unter Verwendung einer anderen Nährstoffzusammensetzung Biotrockenmassekonzentrationen bis zu  $12,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  (vgl. Kapitel 5.5) erreichte, ist zu erwarten, dass eine weitere Verbesserung des Prozesses deutlich gesteigerte Biotrockenmassekonzentrationen ermöglicht. Dabei könnte untersucht werden, ob Gerinne aus anderen Materialien eine Anhaftung verhindern können. Zusätzlich ist eine nähere Untersuchung der maximalen lokalen Energiedissipation in dem verwendeten Flachgerinnereaktor interessant, um mögliche Veränderungen der Reaktorgeometrie zu identifizieren, durch die eine Kultivierung schersensitiver Mikroalgen ermöglicht werden kann.

## 7 Extraktion von $\beta$ -Carotin aus Algenbiomasse

Da  $\beta$ -Carotin in Wasser unlöslich und in vielen organischen Lösemitteln nur in geringen Konzentrationen löslich ist, liegt ein wichtiger Schritt bei der Etablierung eines Prozesses zur Gewinnung des Produkts in der Wahl eines geeigneten Lösemittels. Zusätzlich muss bei der Extraktion eines intrazellulär vorliegenden Stoffes die Notwendigkeit eines Zellaufschlusses überprüft werden. Abschließend wurde untersucht, ob eine Zentrifugalextraktion für die Extraktion von  $\beta$ -Carotin ebenso genutzt werden kann.

### 7.1 Identifikation eines geeigneten Lösemittels

Zur Identifikation eines geeigneten Lösemittels wurden einstufige Extraktionsprozesse, wie in Kapitel 4.5.4 beschrieben, durchgeführt. Zellsuspension und nicht mit Wasser mischbare Lösemittel lagen dabei in gleicher Menge vor und wurden zur Erhöhung der Kontaktfläche in einer Schwingmühle gemischt. Die Phasentrennung erfolgte über Zentrifugation (vgl. Kapitel 4.5.4). Bei den verwendeten Lösemitteln handelte es sich um Chloroform, Ethylacetat, Heptan, Hexan und eine Hexan-Ethanol-Mischung (9/1, v/v). Die ermittelten  $\beta$ -Carotin- und Lutein-Konzentrationen im Lösemittel sind in Abbildung 7.1 zusammengefasst. Das als Nebenprodukt vorliegende Xanthophyll Lutein wurde zur Bestimmung der Selektivität genutzt.



**Abbildung 7.1:** Vergleich der extrahierten Menge an  $\beta$ -Carotin (hellgrau) und Lutein (weiß) aus *D. salina* CCAP19/18 bei der einstufigen Extraktion in einer Schwingmühle ohne Glaskügelchen mit anschließender Phasentrennung im Zentrifugalfeld. Die konzentrierte Zellsuspension entstammte einem Satzprozess bei Salzsteigerung von 35-110  $\text{g L}^{-1}$  NaCl mit „BG11+“-Medium. Bei den verwendeten Lösemitteln handelte es sich um Chloroform, Ethylacetat, Heptan, Hexan und einer Hexan-Ethanol-Mischung.

Durch Verwendung der Hexan-Ethanol-Mischung wurde mit 35  $\text{mg L}^{-1}$  die höchste  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel erreicht. Mit Ethylacetat und Chloroform wurden 30 bzw. 29  $\text{mg L}^{-1}$   $\beta$ -

Carotin extrahiert. Die niedrigste Extraktionseffizienz wies Heptan mit 15 mg L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin auf. Die höchsten Luteinkonzentrationen lagen mit 1,7-1,8 mg L<sup>-1</sup> ebenfalls bei den Lösemitteln Chloroform, Ethylacetat und der Hexan-Ethanol-Mischung. Mit 1,0 mg L<sup>-1</sup> wurde auch hier die niedrigste Konzentration mit Heptan extrahiert.

### Diskussion

Mit den einstufigen Extraktionsprozessen, die in einer Schwingmühle mit nachfolgender Phasentrennung im Zentrifugalfeld durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass alle eingesetzten Lösemittel zu einer Extraktion von  $\beta$ -Carotin führten. Die höchste erreichte Konzentration an  $\beta$ -Carotin wurde in der Hexan-Ethanol-Mischung (9/1) erreicht. Diese lag deutlich über der Konzentration in reinem Hexan. Ethanol ist dafür bekannt, Zellen zu permeabilisieren (Panesar *et al.*, 2007; Somkuti *et al.*, 1998). Der dadurch erleichterte Übergang von  $\beta$ -Carotin durch die Zellmembran ist ein möglicher Grund für die erhöhte Konzentration. Die extrahierten Konzentrationen an  $\beta$ -Carotin stiegen für die übrigen Lösemittel mit sinkendem dekadischen Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten logP (vgl. Tabelle 7.1).

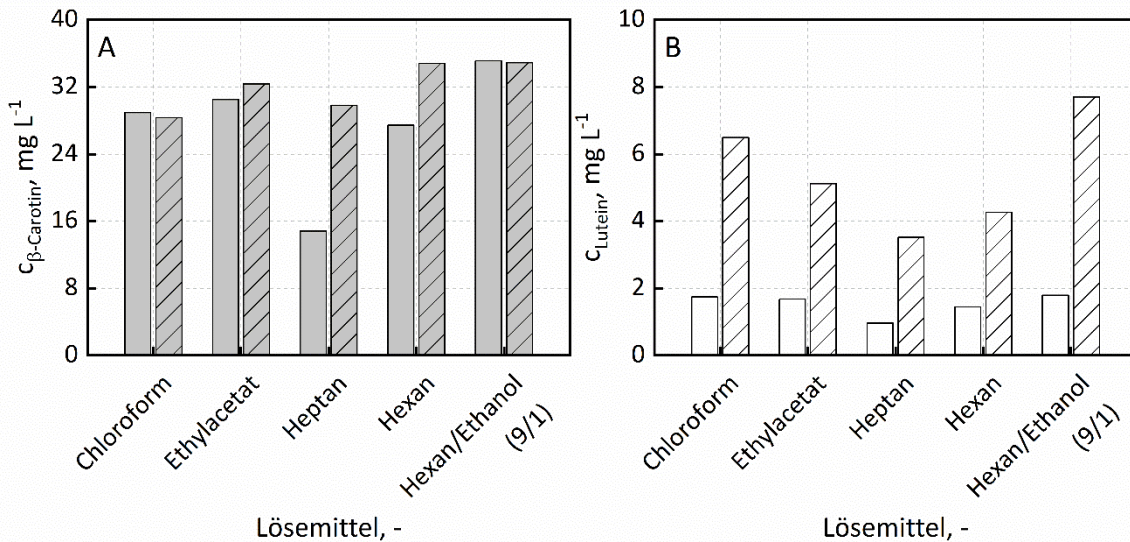
**Tabelle 7.1:** Zusammenfassung von logP-Werten und erzielten  $\beta$ -Carotin-Konzentration bei der Extraktion in einstufigen Extraktionsprozessen in der Schwingmühle.

| Lösemittel                                      | Ethylacetat | Chloroform | Hexan | Heptan |
|---|-------------|------------|-------|--------|
| logP, -   | 0,73        | 1,97       | 3,90  | 4,66   |
| $c_{\beta\text{-Carotin}}$ , mg L <sup>-1</sup> | 30,5        | 28,9       | 27,4  | 15     |

Die maximale Löslichkeit von  $\beta$ -Carotin bei Raumtemperatur liegt in Ethylacetat bei 500 mg L<sup>-1</sup>, in Chloroform bei 2000 mg L<sup>-1</sup> und für Hexan bei 600 mg L<sup>-1</sup> (Craft & Soares, 1992). Das zeigt, dass die Kapazität der Lösemittel mit Konzentrationen von etwa 30 mg L<sup>-1</sup> noch nicht erschöpft war.

### 7.2 Einfluss des Zellaufschlusses auf die Extraktion

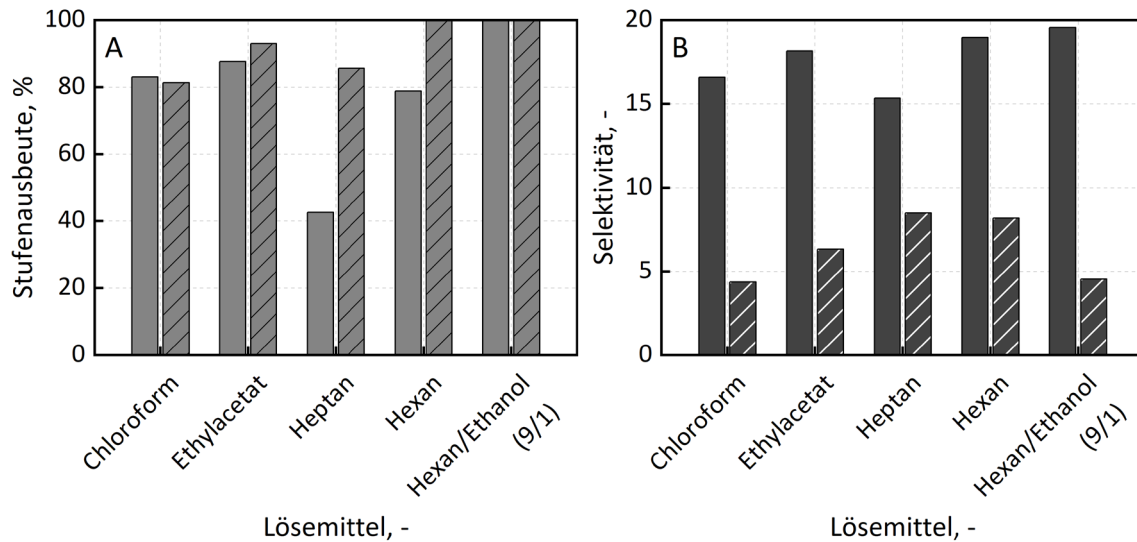
Um zu überprüfen, ob ein mechanischer Zellaufschluss zu einer Erhöhung der extrahierten Produktkonzentrationen führt, wurden die bereits vorgestellten einstufigen Extraktionsexperimente mit Extraktionen unter Zugabe von Glaskügelchen in der Schwingmühle mit Phasentrennung im Zentrifugalfeld verglichen (vgl. Kapitel 4.5.4). Der Vergleich der Produktkonzentrationen mit und ohne mechanischem Zellaufschluss ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Zellaufschluss und Extraktion erfolgten gleichzeitig, da eine Abtrennung der Glaskügelchen nicht ohne Verluste von  $\beta$ -Carotin möglich war.



**Abbildung 7.2:** Vergleich der extrahierten Menge an  $\beta$ -Carotin (hellgrau, A) und Lutein (weiß, B) bei der einstufigen Extraktion in einer Schwingmühle ohne Glaskügelchen und mit Glaskügelchen (schraffiert) mit anschließender Phasentrennung im Zentrifugalfeld. Die konzentrierte Zellsuspension entstammte einem Satzprozess bei Salzsteigerung von  $35\text{-}110 \text{ g L}^{-1}$  NaCl mit „BG11+“-Medium. Bei den verwendeten Lösemitteln handelte es sich um Chloroform, Ethylacetat, Heptan, Hexan und einer Hexan-Ethanol-Mischung.

Die Zugabe von Glaskügelchen führte bei den Lösemitteln Heptan und Hexan zu einer Erhöhung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel. Die mit Chloroform, Ethylacetat und der Hexan-Ethanol-Mischung erreichten Konzentrationen blieben auch mit Glaskügelchen nahezu unverändert. Im Gegensatz zu den nur teilweise erhöhten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen wurde für das Xanthophyll Lutein bei allen untersuchten Lösemitteln eine starke Steigerung der Konzentrationen im Extrakt beobachtet. Die höchste Luteinkonzentration lag dabei mit  $7,7 \text{ mg L}^{-1}$  bei Verwendung von Hexan-Ethanol mit mechanischem Zellaufschluss mehr als viermal so hoch wie ohne.

Für die Auswahl eines geeigneten Extraktionsvorgehens ist nicht allein die maximal erreichte Produktkonzentration entscheidend, auch die Selektivität sollte möglichst hoch sein. Diese beschreibt das Verhältnis von  $\beta$ -Carotin- zu Luteinkonzentration. Auch die Stufenausbeute der Extraktionen ist von Bedeutung. Da für die vorgestellten Daten die Messung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration in der Zellsuspension fehlte, wurde in einer weiteren Extraktion die Stufenausbeute der  $\beta$ -Carotin-Konzentration mit Zellaufschluss und dem Lösemittel Ethylacetat ermittelt. Da von gleichbleibenden Stufenausbeuten ausgegangen werden kann, wurden die Stufenausbeuten der weiteren Lösemittel ebenfalls berechnet. Beide Zustandsgrößen sind in Abbildung 7.3 für die verschiedenen Lösemittel gezeigt.



**Abbildung 7.3:** Stufenausbeute (grau, A) und  $\beta$ -Carotin-Selektivität (dunkelgrau, B). Die Stufenausbeute für Ethylacetat wurde in einer weiteren Extraktion experimentell bestimmt. Da eine gleichbleibende Stufenausbeute bei gleichen Bedingungen vorausgesetzt werden kann, erfolgte die Berechnung der Stufenausbeute der anderen Lösemittel auf deren Basis. Die Selektivität beschreibt das Verhältnis der  $\beta$ -Carotin-Konzentration zur Luteinkonzentration. Die konzentrierte Zellsuspension entstammte einem Satzprozess bei Salzsteigerung von 35-110 g L<sup>-1</sup> NaCl mit „BG11+“-Medium. Bei den verwendeten Lösemitteln handelte es sich um Chloroform, Ethylacetat, Heptan, Hexan und einer Hexan-Ethanol-Mischung.

Ohne Zellaufschluss lagen die Stufenausbeuten der  $\beta$ -Carotin-Extraktion für Ethylacetat (88 %) und die Hexan-Ethanol-Mischung (100 %) am höchsten. Eine Steigerung der Stufenausbeute konnte mit Zellaufschluss nur für Heptan von 43 auf 86 % und für Hexan von 79 auf 100 % beobachtet werden.

Durch einen Zellaufschluss wurde darüber hinaus die  $\beta$ -Carotin-Selektivität für alle eingesetzten Lösemittel deutlich verringert. Die höchsten Selektivitäten zwischen 18,2-19,5 wurden in den Extraktionen mit Hexan, Ethylacetat und der Hexan-Ethanol-Mischung erreicht.

### Diskussion

Bei Extraktionsversuchen mit mechanischem Zellaufschluss durch Glaskügelchen konnte die extrahierte  $\beta$ -Carotin-Menge für Heptan und Hexan gesteigert werden. Die geringe Steigerung der Stufenausbeute mit und ohne mechanischen Zellaufschluss für Chloroform, Ethylacetat und der Hexan-Ethanol-Mischung unterstützen die Vermutung, dass diese Lösemittel die Membran teilweise passieren können und so eine größere Permeabilität der Zellmembran erreichen. Dadurch wurde vermutlich der Übergang von  $\beta$ -Carotin in die organische Phase erleichtert. Durch den mechanischen Aufschluss wurde auch der Übergang von  $\beta$ -Carotin in die Lösemittel Heptan und Hexan erhöht, wodurch erhöhte Stufenausbeuten ermittelt wurden. Beim Extraktionsverhalten von Lutein traten deutliche Unterschiede dazu auf. Bei allen Lösemitteln wurde die Konzentration an Lutein deutlich mit mechanischem Zellaufschluss erhöht. Da sowohl Lutein als auch  $\beta$ -Carotin in Öltröpfchen im Interthylakoidraum gespeichert werden (Ben-Amotz *et al.*, 1982; Borowitzka & Borowitzka, 1988),

kommt der Speicherort als Erklärung für die großen Unterschiede nicht in Frage. Ein Grund könnte in den unterschiedlichen Eigenschaften der Stoffe liegen. Der dekadische Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten  $\log P$  von  $\beta$ -Carotin liegt mit 17,6 deutlich höher als  $\log P$  7,9 von Lutein. Damit ist  $\beta$ -Carotin hydrophober als Lutein. Zudem beeinflusst die Anwesenheit der Glaskügelchen auch die Tröpfchengröße des Lösemittels und damit die Grenzfläche. Aufgrund der höheren Grenzfläche und der mechanischen Zerstörung der Zellmembran ist es möglich, dass sich das Gleichgewicht der Carotinoide zwischen Zellsuspension und organischer Phase schneller einstellt und deshalb mehr Lutein extrahiert werden konnte. Auch bei anderen Mikroorganismen konnte gezeigt werden, dass die extrahierte Menge an Carotinoiden durch Zellaufschluss gesteigert wurde (Michelon *et al.*, 2012; Uquiche *et al.*, 2016).

Die untersuchte Zustandsgröße der Selektivität ist entscheidend für die Auswahl des Lösemittels. Soll das Produkt möglichst rein extrahiert werden, muss sie einen hohen Wert aufweisen. Soll das Nebenprodukt hingegen zur Erhöhung der Wertschöpfung ebenfalls gewonnen werden, spielt die Selektivität keine große Rolle. Als geeignete Lösemittel für eine hohe Selektivität wurden hier Hexan-Ethanol und Ethylacetat identifiziert.

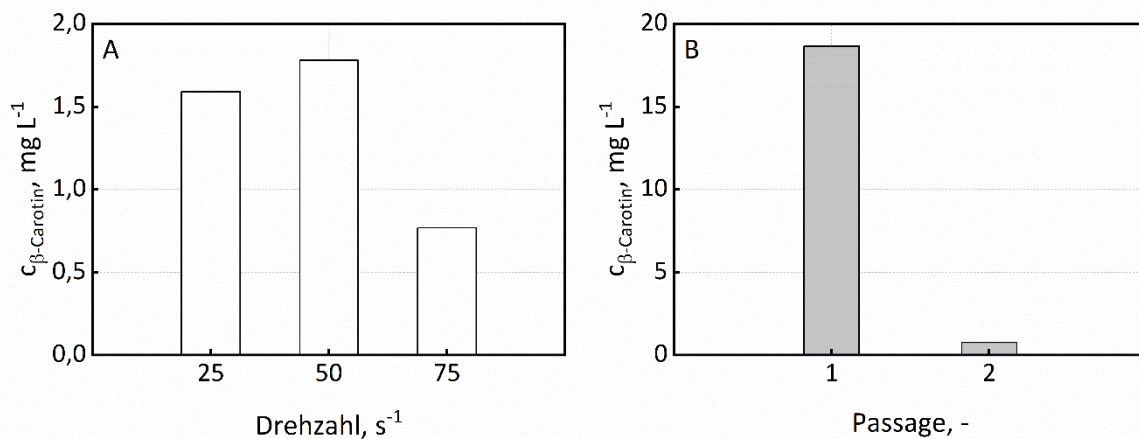
Die Einstufung der Lösemittel nach GHS (*Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals*) ist Hexan langfristig gewässergefährdend (H411) und gesundheitsschädlicher als Ethylacetat. Daher wurde Ethylacetat auch für Extraktionsversuche mit großen Lösemittelmengen im Zentrifugalextraktor als geeignet befunden.

Ein großer Vorteil der direkten Extraktion aus Zellsuspension ist der fehlende Trocknungsschritt verglichen zur Extraktion aus Biotrockenmasse. Der hohe Energieaufwand für eine Trocknung kann bis zu 30 % der Gesamtkosten betragen (Tiburcio *et al.*, 2007). Durch den fehlenden Schritt des mechanischen Zellaufschlusses wird der Extraktionsprozess zusätzlich einfacher gestaltet.

### 7.3 Extraktion im Zentrifugalextraktor

Die  $\beta$ -Carotin-Extraktion wurde mit dem ausgewählten Lösemittel Ethylacetat im Zentrifugalextraktor untersucht. Zur Identifikation geeigneter Extraktionsbedingungen im Zentrifugalextraktor wurden verschiedene Variablen verändert. Die Auswahl der Wehrscheibe erfolgte basierend auf den Dichteunterschieden der beiden Phasen (vgl. Kapitel 4.3). Aufgrund der großen Probemengen wurden die Experimente in Einfachbestimmung mit Zellsuspension aus unterschiedlichen Satzprozessen durchgeführt. Darüber hinaus mussten die genutzten Zellsuspensionen teilweise verdünnt werden, um genügend Volumen zu erlauben. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Extraktionen im Zentrifugalextraktor wurden einige Experimente im Dreifachansatz mit derselben Zellsuspension durchgeführt. Das gewählte Phasenverhältnis lag bei 1:1 (vgl. Kapitel 4.3).

Da die Drehzahl des Zentrifugalextraktors sowohl die Grenzfläche als auch die Geschwindigkeit der Trennung und somit die Einwirkzeit beeinflusst, wurde zunächst überprüft, bei welcher Drehzahl des Zentrifugalextraktors am meisten  $\beta$ -Carotin in Ethylacetat extrahiert werden kann. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine Passage für die Extraktion ausreicht oder eine zweite Passage notwendig ist. Die für die verschiedenen Drehzahlen zwischen 25-75  $s^{-1}$  und den Vergleich zwischen erster und zweiter Passage ermittelten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen sind in Abbildung 7.4 zusammengefasst. Da keine Absolutbestimmung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration vorlag, war hier die Angabe von Stufenausbeuten nicht möglich.



**Abbildung 7.4:** Veränderung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel Ethylacetat bei unterschiedlichen Drehzahlen (A) und nach der ersten bzw. zweiten Passage (B) im Zentrifugalextraktor.

**A:** Die Zellsuspension wurde einem Satzprozess mit „BG11+“-Medium bei konstanter Salzkonzentration ( $35 g L^{-1}$ ) entnommen. Die Extraktion erfolgte mit einer Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von 23,5 mm und einem Volumenstrom von Ethylacetat und Algensuspension von  $50 mL min^{-1}$  im Phasenverhältnis 1:1 (mittlere hydraulische Verweilzeit: 1,6 min).

**B:** Die Zellsuspension wurde einem Satzprozess mit „BG11+“-Medium bei steigender Salzkonzentration ( $35-110 g L^{-1}$ ) entnommen. Die Extraktion erfolgte mit einer Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von 23,5 mm, einer Drehzahl von  $40 s^{-1}$  und einem Volumenstrom von Ethylacetat und Algensuspension von  $50 mL min^{-1}$  im Phasenverhältnis 1:1 (mittlere hydraulische Verweilzeit: 1,6 min).

Die extrahierte Konzentration an  $\beta$ -Carotin nahm im Lösemittel bei einer Erhöhung der Drehzahl von 25 auf 50 Hz (mittlere hydraulische Verweilzeit: 1,6 min) leicht von 1,6 auf 1,8  $mg L^{-1}$  zu. Bei weiterer Steigerung der Drehzahl auf 75  $s^{-1}$  sank die  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel deutlich auf 0,8  $mg L^{-1}$  ab.

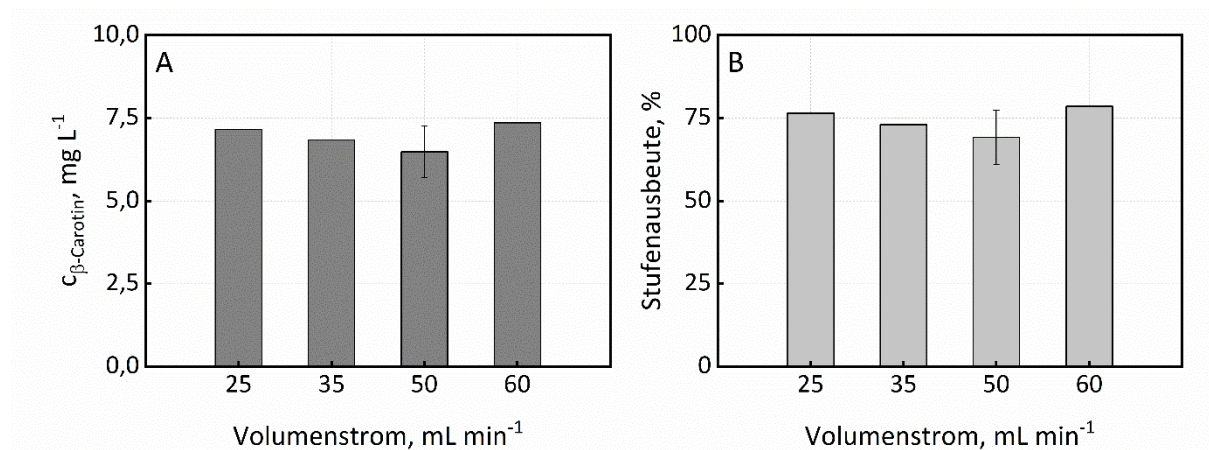
Bei Vergleich der extrahierten Konzentration an  $\beta$ -Carotin nach der ersten und zweiten Passage, konnte festgestellt werden, dass in der zweiten Passage nur noch 0,8  $mg L^{-1}$  extrahiert wurden. Das entspricht lediglich 4 % der in beiden Passagen zusammen extrahierten  $\beta$ -Carotin-Konzentration. Der Großteil wurde mit 18,6  $mg L^{-1}$  bereits in der ersten Passage extrahiert.

Eine weitere wichtige Stellgröße ist der Volumenstrom der eingesetzten Phasen, da dieser die Verweilzeit und somit die Kontaktzeit der Phasen beeinflusst. Der Volumenstrom wurde für beide



Phasen gleich gehalten und zwischen  $25\text{-}60\text{ mL min}^{-1}$  variiert. So wurden mittlere hydraulische Verweilzeiten zwischen  $1,3\text{-}3,2\text{ min}$  erreicht. Die dabei ermittelten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen sowie die Extraktionsausbeute aus einem Satzprozess mit *D. salina* CCAP19/18 bei steigendem Salzgehalt bis  $110\text{ g L}^{-1}$  NaCl mit dem „BG11 Biomass“-Medium sind in Abbildung 7.5 gezeigt.

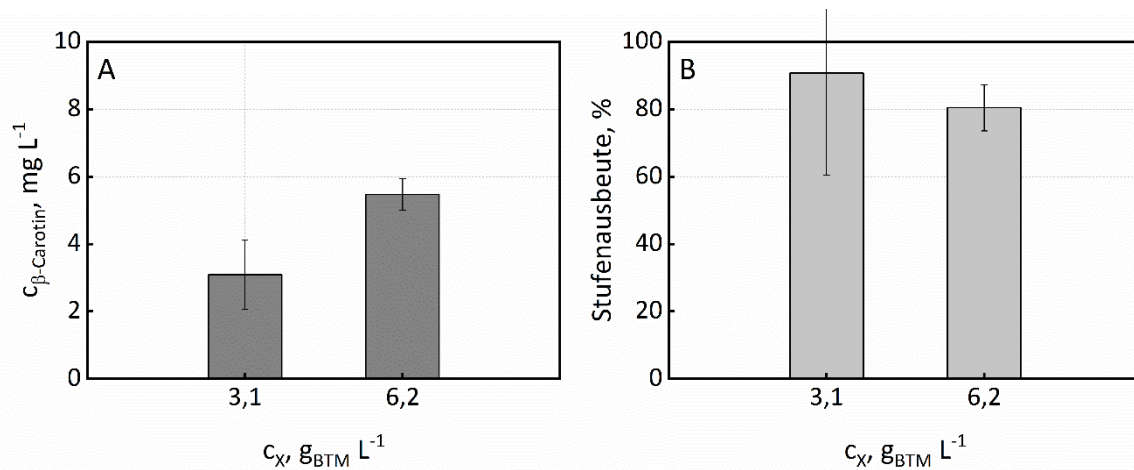
Als Referenz wurde in der Zellsuspension mit  $2,8\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  die  $\beta$ -Carotin-Konzentration zu  $9\text{ mg L}^{-1}$  bestimmt. Die durch Zentrifugalextraktion erreichten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen betragen zwischen  $6,5\text{-}7\text{ mg L}^{-1}$ . Bei einem Volumenstrom von  $50\text{ mL min}^{-1}$  konnte zudem eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen gezeigt werden. Bezogen auf die analytisch ermittelte Gesamtkonzentration von  $\beta$ -Carotin ergaben sich aus den ermittelten Konzentrationen Ausbeuten zwischen  $70\text{-}80\%$  nach der ersten Passage im Zentrifugalextraktor. Im untersuchten Bereich zwischen  $25\text{-}60\text{ mL min}^{-1}$  scheint der Volumenstrom keinen signifikanten Einfluss auf die  $\beta$ -Carotin-Extraktion zu haben.



**Abbildung 7.5:** Veränderung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel Ethylacetat (A) und der Extraktionsausbeute (B) bei unterschiedlichen Volumenströmen durch den Zentrifugalextraktor. Die Zellsuspension wurde einem Satzprozess mit „BG11 Biomass“-Medium und steigender Salzkonzentration ( $35\text{-}110\text{ g L}^{-1}$ ) entnommen und durch Verdünnung auf die verwendete Biotrockenmassekonzentration von  $2,8\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  eingestellt. Die Extraktion erfolgte mit einer Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von  $23,5\text{ mm}$ , einer Drehzahl von  $50\text{ s}^{-1}$  und Volumenströmen von Ethylacetat und Algensuspension zwischen  $25\text{-}60\text{ mL min}^{-1}$  im Phasenverhältnis  $1:1$  (mittlere hydraulische Verweilzeiten:  $1,3\text{-}3,2\text{ min}$ ).

Da die Kosten für die Extraktion durch Verringerung des Lösemittelverbrauchs gesenkt werden können, ist eine möglichst hohe Biomasse- und damit auch Produktkonzentration in der wässrigen Phase von Vorteil. Daher wurden die Extraktionen aus Zellsuspensionen mit Biotrockenmassekonzentrationen zwischen  $3,1\text{-}12,3\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  durchgeführt und in Abbildung 7.6 miteinander verglichen.

Mit einer Biotrockenmassekonzentration der Zellsuspension von  $12,3\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  wurde bei Durchmischung im Zentrifugalextraktor mit der Lösemittelphase eine stabile Emulsion ausgebildet, die im Zentrifugalextraktor bei den gewählten Betriebsbedingungen nicht getrennt werden konnte. Daher konnte keine  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel festgestellt werden und keine Ausbeute bestimmt werden.



**Abbildung 7.6:** Veränderung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration im Lösemittel Ethylacetat (A) und der Extraktionsausbeute (B) bei unterschiedlichen Biotrockenmassekonzentrationen der Zellsuspension. Die Zellsuspension wurde einem Satzprozess mit „BG11 Biomass“-Medium und steigender Salzkonzentration (35-110 g L<sup>-1</sup>) entnommen. Die Extraktion erfolgte mit einer Wehrscheibe mit einem Lochdurchmesser von 23,5 mm, einer Drehzahl von 50 s<sup>-1</sup> und einem Volumenstrom von Ethylacetat und Algensuspension von je 50 mL min<sup>-1</sup> im Phasenverhältnis 1:1 (mittlere hydraulische Verweilzeit: 3,2 min).

Bei einer Biotrockenmassekonzentration von 3,1 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> wurde mit einer  $\beta$ -Carotin-Konzentration von 3,1 mg L<sup>-1</sup> eine Extraktionsausbeute von 91 % erzielt. Bei Verdopplung der Biotrockenmassekonzentration auf 6,2 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> lag die im Lösemittel vorliegende Konzentration an  $\beta$ -Carotin bei 5,5 mg L<sup>-1</sup>, was einer Ausbeute von 80 % entsprach.

## Diskussion

Mit den durchgeführten Experimenten im Zentrifugalextraktor konnte gezeigt werden, dass eine Extraktion von  $\beta$ -Carotin aus der Algensuspension ohne vorherigen mechanischen Zellaufschluss möglich war. Bei den als geeignet identifizierten Bedingungen konnten Stufenausbeuten von etwa 80 % bei der direkten Extraktion aus der Biomassesuspension erreicht werden. Ähnliche Ausbeuten wurden bei der Extraktion von anderen Stoffen aus Zellsuspension erreicht (Kurzrock, 2010).

Die verringerte Stufenausbeute verglichen mit der einstufigen Extraktion in der Schwingmühle könnte auf die geringere Kontaktzeit von Zellsuspension und organischem Lösemittel zurückzuführen sein. Während die Extraktionen in der Schwingmühle für 10 min durchgeführt wurden, betrug die mittlere hydraulische Verweilzeit im Zentrifugalextraktor zwischen 1,3-3,2 min. In diesem Zeitraum findet sowohl die Durchmischung als auch die Trennung statt, weswegen auch geringere Kontaktzeiten auftreten können. Die Erhöhung der Verweilzeit kann durch die Verringerung des Volumenstroms oder durch den Einsatz einer größeren Zentrifuge stattfinden.

Der direkte Vergleich bei verschiedenen Drehzahlen deutet darauf hin, dass eine Drehzahl von 50 s<sup>-1</sup> gut für die Extraktion geeignet ist. Bis zu dieser Drehzahl schien die Konzentration an  $\beta$ -Carotin im Lösemittel aufgrund der besseren Durchmischung im Spalt zwischen den beiden Zylindern zu steigen.

Bei höheren Drehzahlen scheint eine Abnahme der  $\beta$ -Carotin-Konzentration stattzufinden, was auf eine schnellere Phasentrennung und die damit verbundene kürzere Kontaktzeit zurückzuführen sein kann.

Aufgrund der geringen vorhandenen Zellsuspensionsmengen konnten nur Volumenströme zwischen 25-60 mL min<sup>-1</sup> (mittlere hydraulische Verweilzeiten: 1,3-3,2 min) untersucht werden. Eine Verringerung des Volumenstroms war wegen der verwendeten Pumpen nicht möglich. Falls auch bei niedrigeren Volumenströmen keine Erhöhung der Stufenausbeute auftreten würde, könnten bei gleichbleibender Stufenausbeute höhere Volumenströme dazu beitragen den Extraktionsprozess zeiteffizienter zu gestalten (Cunningham *et al.*, 1989). Eine Passage im Zentrifugalextraktor wurde darüber hinaus als ausreichend für die Extraktion befunden, da eine weitere Passage nur wenig mehr Produkt verfügbar machte.

Die beobachtete Emulsionsbildung, die bei Biotrockenmassekonzentrationen von 12,3 g<sub>BTM</sub> L<sup>-1</sup> beobachtet wurde, verhindert die Einsparung von Lösemittel durch höher konzentrierte Zellsuspensionen. Die Entstehung der stabilen Emulsion ist wahrscheinlich auf die Wechselwirkungen von organischem Lösemittel mit den zelleigenen Lipiden, Proteinen und Exopolysacchariden zurückzuführen. Law *et al.* (2018) zeigten, dass eine stabile Emulsion durch ein Zusammenspiel der verschiedenen in der Zelle vorliegenden Stoffe stattfindet. Gerade Proteine stabilisieren emulgierte Lösemitteltropfen und verhindern eine Trennung der Phasen durch Zentrifugation. Um einen effizienteren Extraktionsprozess zu erreichen, könnte durch eine Vorbehandlung der Zellsuspension eine Fällung der Proteine herbeigeführt werden. Dadurch könnte eine Emulsionsbildung vermieden werden. Die Kapazität des Lösemittels für  $\beta$ -Carotin liegt außerdem deutlich über den bisher extrahierten  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen. Somit ist eine Veränderung des Phasenverhältnisses von wässriger Phase und Ethylacetat eine weitere Möglichkeit, Lösemittel einzusparen. Außerdem könnte bereits genutztes Ethylacetat mehr als einmal für zu extrahierende Algensuspension wiedergenutzt werden. Bei ausreichender Beladung des Lösemittels kann dieses wegen des niedrigen Siedepunkts von 77,1 °C einfach zurückgewonnen und erneut eingesetzt werden. Die Rückgewinnung wäre über Vakuumverdampfung bei 40 °C und 240 mbar denkbar (Büchi Labortechnik AG, 2016).

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Das breite mit Mikroalgen photoautotroph herstellbare Spektrum an Wertstoffen stellt eine nachhaltige Alternative zu oftmals energieaufwendigen chemischen Herstellungsverfahren dar. Da die Herstellung von Mikroalgen als Rohstoff zur Kraftstoffherstellung allerdings bezogen auf die Herstellungskosten eine niedrige Wertschöpfung aufweist, ist die Nutzbarmachung hochwertiger intrazellulärer Mikroalgenprodukte sinnvoll. Zu diesen zählen beispielsweise Carotinoide, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Polysaccharide, Vitamine und Proteine (Chmiel & Weuster-Botz, 2018; Michalak & Chojnacka, 2015; Posten & Walter, 2012). Der halotolerante Algenstamm *Dunaliella salina* ist für die Produktion von  $\beta$ -Carotin bekannt und wird in großen Salzseen oder in *Raceway Ponds* kultiviert (Ben-Amotz, 1999). Freilandkultivierungen unterliegen dynamischen Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Es treten über den Tag hinweg aber auch beeinflusst von den Jahreszeiten Variationen der Temperatur sowie des Lichteintrags auf. Zudem führt die Verdunstung von Wasser zu einem Anstieg der Salinität im Reaktor. Bisher werden jedoch die meisten Studien im Labormaßstab mit *D. salina* unter konstant gehaltenen Prozessbedingungen (Licht, Temperatur, Salinität) durchgeführt (Khadim *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; Morowvat & Ghasemi, 2016; Roopnarain *et al.*, 2014; Wongsansilp *et al.*, 2016). Daher war die erste Zielsetzung dieser Arbeit die Charakterisierung von *D. salina*-Stämmen im Hinblick auf Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Produktion unter typischen Klimabedingungen (Tag-Nachtganglinien von Temperatur und Licht). Hierzu wurden geschlossene Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren mit LED-Beleuchtung im Labormaßstab verwendet, um die Reaktionsbedingungen vollständig kontrollieren zu können.

Die Herstellung von *D. salina* in Salzseen oder *Raceway Ponds* findet bei hohen Schichtdicken von etwa 30 cm statt. Eine daraus resultierende Herausforderung liegt in der geringen Lichtverfügbarkeit in der Mikroalgensuspension, durch die niedrige Biomassekonzentrationen zwischen  $0,33\text{-}1,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht werden (Borovkov *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2017). Eine Alternative zu *Raceway Ponds* stellen offene Reaktorsysteme mit einer deutlich verringerten Schichtdicke dar. In einem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München entwickelten Flachgerinnereaktor (Apel, 2017) konnten durch niedrige Schichtdicken der Algensuspension von 0,6 cm sehr hohe Biotrockenmassekonzentrationen von  $> 50 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  mit *Nannochloropsis salina* erzielt werden (Apel *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu *N. salina* (2-4  $\mu\text{m}$ ) ist *D. salina* mit 5-29  $\mu\text{m}$  größer und besitzt keine Zellwand, was diese Alge empfindlich für Scherkräfte macht (Borowitzka & Siva, 2007; Oliveira *et al.*, 1980). Da es bisher keine Literaturdaten zum Wachstum von *D. salina* in Flachgerinnereaktoren gibt, war die zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit die Maßstabsübertragung von Flachplatten-Gaslift-

Photobioreaktoren in Flachgerinnereaktoren zur Herstellung von *D. salina*. Dazu wurden vergleichbare Satzprozesse in beiden Reaktortypen bei Tagesganglinien (Licht, Temperatur) durchgeführt.

Die Aufarbeitung von Mikroalgenbiomasse zur Gewinnung intrazellulär produzierter Stoffe wie  $\beta$ -Carotin stellt bei Bioprocessen einen großen Kostenpunkt dar. Unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Extraktion von  $\beta$ -Carotin mit Lösemitteln aus *D. salina*-Biomasse sind bereits bekannt. Zur Extraktion werden sowohl schwer verdampfbare Pflanzenöle (Nonomura, 1987; Rose *et al.*, 1994) als auch nicht mit Wasser mischbare organische Lösemittel (Rüegg, 1984) in aufwendigen Prozessen mit Erhitzen oder Trocknung verwendet (Nonomura, 1987; Rose *et al.*, 1994; Rüegg, 1984). Der hohe Energieaufwand für die Trocknung von Biomasse kann alleine bis zu 30 % der Gesamtkosten an der Produktion von Mikroalgen ausmachen (Tiburcio *et al.*, 2007). Eine Möglichkeit, Prozessschritte zu vermeiden, ist die direkte Extraktion aus Mikroalgensuspension. Daher wurde als dritte Zielsetzung die direkte Extraktion von  $\beta$ -Carotin aus einer wässrigen *D. salina*-Suspension untersucht. Wichtige Anforderungen an das verwendete Lösemittel sind eine schlechte Mischbarkeit mit Wasser und eine gute Rückgewinnbarkeit. Bei der Extraktion wurde aufgrund des hohen Energieaufwands auf Erhitzen und Trocknung verzichtet.

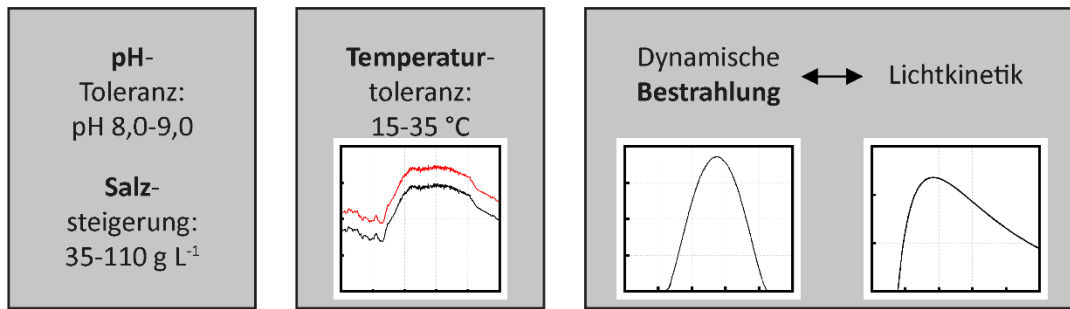
Im Rahmen der reaktionstechnischen Charakterisierung wurden zunächst *D. salina*-Stämme bei Tagesganglinien von Licht und Temperatur (15. Juni 2012, Almería, Spanien) in vollständig kontrollierbaren Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren sowohl bei konstanter als auch bei steigender Salinität verglichen. Alle untersuchten *D. salina*-Stämme (SAG184.80, SAG42.88, SAG19-03, CCAP19/18) tolerierten Salzkonzentrationen über  $200 \text{ g L}^{-1}$ . *D. salina* CCAP19/18 erreichte in den durchgeführten Satzprozessen mit Salzsteigerung die höchste volumetrische  $\beta$ -Carotin-Konzentration von  $7 \text{ mg L}^{-1}$ , die 18-33 % höher lag als mit den anderen Stämmen. Dabei wurde mit  $1,9 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  der zweithöchste intrazelluläre  $\beta$ -Carotin-Gehalt erreicht, nur *D. salina* SAG19-03 lag mit  $2,1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  leicht darüber. Da im Satzprozess mit *D. salina* CCAP19/18 zusätzlich eine kürzere Verzögerungsphase beobachtet wurde und die Raum-Zeit-Ausbeute an Biotrockenmasse 20-50 % höher lag als bei den anderen Stämmen, wurde dieser Stamm für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Bei Satzprozessen mit steigendem Salzgehalt bei unterschiedlichem pH konnte gezeigt werden, dass der ausgewählte Stamm zwischen pH 8,0-9,0 ähnliche Wachstumskurven und Verläufe der  $\beta$ -Carotin-Konzentration aufwies. Die erreichten Biotrockenmassekonzentrationen lagen unter den betrachteten Klimabedingungen zwischen  $3,8-3,9 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , die  $\beta$ -Carotin-Konzentrationen zwischen  $3,8-4,4 \text{ mg L}^{-1}$ . Schwankungen in diesem pH-Bereich können in Freilandkultivierungen von *D. salina* CCAP19/18 also toleriert werden. Ein hoher pH ist in Freilandkultivierungen aufgrund der Reduktion des Kontaminationsrisikos von Vorteil. Da jedoch bei pH 9,0 eine längere Verzögerungsphase beobachtet wurde, fanden weitere Satzprozesse bei pH 8,5 statt.

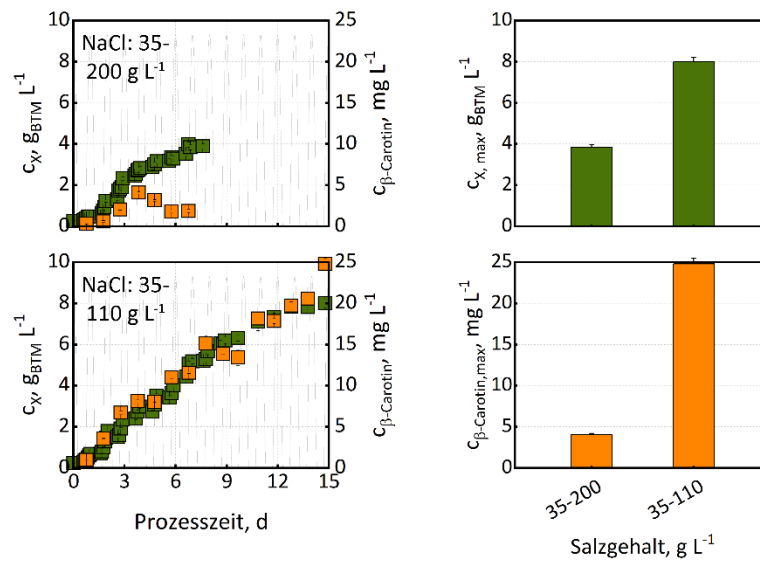
Da bei der Algenproduktion im Freiland auch höhere Temperaturen auftreten können, wurde untersucht, wie sich mögliche Temperaturerhöhungen auf die Produktion von Biomasse und  $\beta$ -Carotin auswirken. Dazu wurde das verwendete Temperaturprofil um 5 °C erhöht, sodass die Temperatur über den Tagesverlauf statt im Bereich zwischen 15-30 °C nun zwischen 20-35 °C lag. Im Wachstumsverlauf wurden keine Unterschiede festgestellt, in beiden Satzprozessen wurden  $4,2 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  erreicht. Die maximale  $\beta$ -Carotin-Konzentration variierte leicht zwischen  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  (15-30 °C) und  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$  (20-35 °C). Wachstum und  $\beta$ -Carotin-Bildung von *D. salina* CCAP19/18 sind im Temperaturbereich zwischen 15-35 °C somit nicht verändert.

Da bei allen Satzprozessen mit zunehmender Salzkonzentration eine Abnahme der  $\beta$ -Carotin-Konzentration und des -Gehalts nach etwa 3,7 d beobachtet wurde, wurde zu diesem Zeitpunkt die Salzzugabe gestoppt. Die Salinität im so durchgeführten Satzprozess stieg also bis  $110 \text{ g L}^{-1}$  und wurde im Anschluss konstant gehalten. So konnte erreicht werden, dass der  $\beta$ -Carotin-Gehalt konstant zwischen  $2\text{-}3 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  blieb und die volumetrische  $\beta$ -Carotin-Konzentration bis zum Prozessende auf  $25 \text{ mg L}^{-1}$  anstieg. Auch die Biotrockenmassekonzentration wurde nahezu auf  $8,0 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  verdoppelt. Eine weitere Steigerung der Biotrockenmassekonzentration auf  $12,8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  konnte durch die Verwendung eines an die Zusammensetzung mariner Mikroalgen angepassten „BG11 Biomass“-Mediums erzielt werden. Allerdings blieb bei Satzprozessen mit „BG11 Biomass“-Medium der  $\beta$ -Carotin-Gehalt nach Erreichen eines Maximums nicht konstant wie mit „BG11+“-Medium, sondern sank von  $3 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  auf  $1 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Da keine Unterschiede im Lichtabsorptionsverhalten festzustellen waren, wird eine Nährstofflimitierung von Phosphat, Ammoniumeisencitrat und/oder Magnesiumsulfat des „BG11+“-Mediums als Ursache für den stabilen  $\beta$ -Carotin-Gehalt vermutet.

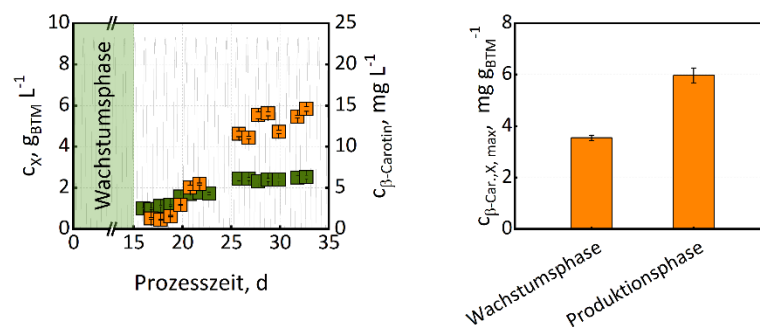
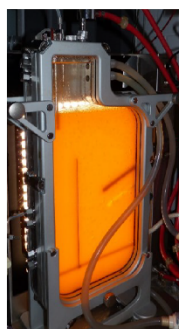
Da neben den autotrophen Nährstoffen die Versorgung mit Licht ein Haupteinflussfaktor auf Wachstum und Produktbildung mit *D. salina* ist, wurde die Lichtabhängigkeit des Wachstums von *D. salina* CCAP19/18 untersucht. Dazu wurden Satzprozesse mit unterschiedlicher Inokulationskonzentration und dynamischer Klimasimulation durchgeführt. Durch die verschiedenen Biomassekonzentrationen im Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktor konnten unterschiedliche Lichtverfügbarkeiten erreicht werden. Als besonders gut geeignet für die Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Biotrockenmassekonzentration und Absorptionsverhalten im Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktor erwies sich das Lichtabschwächungsmodell nach Havel (Havel, 2006). Durch Integration des Lichtabschwächungsmodells über die konstante Schichtdicke der Mikroalgensuspension und Integration der zunehmenden Zelldichte in der täglichen exponentiellen Wachstumsphase wurden mittlere integrale Photonenflussdichten bestimmt. Die mittlere integrale Photonenflussdichte beschreibt gemittelt über Schichtdicke und Zeit die Photonenflussdichte, die den Mikroalgen im Durchschnitt während einer exponentiellen Wachstumsphase zur Verfügung steht.



**Wachstumsphase: Verdopplung Biotrockenmassekonzentration  
Versechsfachung  $\beta$ -Carotin-Konzentration**



**Produktionsphase: Verdopplung  $\beta$ -Carotin-Gehalt**



**Abbildung 8.1:** In der vorliegenden Arbeit konnte mit reaktionstechnischen Untersuchungen in Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren gezeigt werden, dass *D. salina* CCAP19/18 bei Tagesganglinien von Temperatur und Licht eines Sommertags am Mittelmeer (15. Juni 2012, Almería, Spanien) eine hohe pH-Toleranz zwischen pH 8,0-9,0 aufweist. Auch bei um 5 °C höheren Temperaturen wurde gleichbleibendes Wachstum festgestellt. Die Wachstumskinetik von *D. salina* CCAP19/18 konnte auch bei dynamischer Eingangspotonenflussdichte in Abhängigkeit der mittleren integralen Photonenflussdichte bestimmt werden. Bei einer Steigerung der Salinität von 35-110 g L<sup>-1</sup> NaCl konnte in der Wachstumsphase eine Verdopplung der Biotrockenmassekonzentration sowie eine Versechsfachung der  $\beta$ -Carotin-Konzentration erzielt werden. Durch Reduktion der Phosphat- und Nitratkonzentrationen konnte bei gleichzeitiger Erhöhung der Lichtverfügbarkeit in der nachfolgenden Produktionsphase eine Verdopplung des  $\beta$ -Carotin-Gehalts in *D. salina* CCAP19/18 erreicht werden.

Für die mathematische Beschreibung des Zusammenhangs von exponentiellen Wachstumsraten und mittleren integralen Photonenflussdichten wurde im Rahmen der Beobachtungsgenauigkeit das Modell der Lichtinhibierung nach Aiba-Edwards (Aiba *et al.*, 1968; Edwards, 1970) mit Einführung einer minimalen Photonenflussdichte, deren Überschreitung für exponentielles Wachstum notwendig ist, als geeignet für *D. salina* CCAP19/18 in Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Photonenflussdichten  $< 233 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kein exponentielles Wachstum bewirken, die Sättigungskonstante  $K_S$  bei  $277 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und die Inhibierungskonstante bei  $674 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  lag und eine optimale Wachstumsrate von  $2,36 \text{ d}^{-1}$  bei  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auftrat.

Neben der Identifikation der besten Wachstumsbedingungen war auch eine Steigerung von  $\beta$ -Carotinhalt und -Konzentration interessant. Das verwendete „BG11+“-Medium führte in Verbindung mit einer Salzsteigerung bis  $110 \text{ g L}^{-1}$ , wie in Abbildung 8.1 gezeigt, zu einer Steigerung des maximalen  $\beta$ -Carotinhalts um 130 % von  $3,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  verglichen mit  $1,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$  bei einer Salzsteigerung bis  $200 \text{ g L}^{-1}$ . Auch die Biotrockenmassekonzentration und die  $\beta$ -Carotin-Konzentration wurden deutlich von  $4 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$  auf  $8 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ , bzw. von  $4 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $25 \text{ mg L}^{-1}$   $\beta$ -Carotin gesteigert.

In der anschließenden Produktionsphase führte eine konstant bei  $110 \text{ g L}^{-1}$  gehaltene Salinität in Verbindung mit einem Nährstoff-limitierten Medium (Phosphat- und Nitratreduktion), sowie einer erhöhten Lichtverfügbarkeit durch eine reduzierte Biotrockenmassekonzentration zu einer Verdopplung des  $\beta$ -Carotinhalts von *D. salina* CCAP19/18 auf  $6 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ . Durch die niedrigen Nährstoffkonzentrationen lag eine deutlich niedrigere Biomassekonzentration als in der Wachstumsphase vor, so dass damit jedoch die volumetrische  $\beta$ -Carotin-Konzentration mit  $15 \text{ mg L}^{-1}$  geringer war.

Zusätzlich zur Charakterisierung von *D. salina* CCAP19/18 im geschlossenen Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktor, der sich durch einen relativ geringen volumetrischen Leistungseintrag auszeichnet, wurden Wachstum und Produktbildung von *D. salina* CCAP19/18 auch in offenen Flachgerinnereaktoren bei dynamischer Klimasimulation (Tag-/Nachtganglinien von Lichteintrag und Temperatur eines Junitages in Almería, Spanien) untersucht. Eine deutlich längere Verzögerungsphase sowie eine um die Hälfte reduzierte optische Dichte zeigten, dass das Wachstum von *D. salina* CCAP19/18 im offenen Flachgerinnereaktor gegenüber Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren deutlich vermindert war. Aufgrund der berichteten Scherempfindlichkeit von *D. salina* wurde die zur Umwälzung der Algensuspension im Flachgerinnereaktor genutzte Kreiselpumpe gegen eine Schlauchpumpe ausgetauscht, da diese häufig als ein schererärmer förderndes Pumporgan bezeichnet wird (Jaouen *et al.*, 1999; Michels *et al.*, 2016). Dabei musste allerdings aufgrund einer stark pulsierenden Förderung der Volumenstrom reduziert werden, so dass der volumetrische Leistungseintrag von  $530 \text{ W m}^{-3}$  mit Kreiselpumpe auf  $380 \text{ W m}^{-3}$  mit Schlauchpumpe verringert wurde. Die maximale optische Dichte  $\text{OD}_{750 \text{ nm}}$  wurde so im Satzverfahren mit Klimasimulation von 1,7 leicht auf 2,2 gesteigert. In beiden



Satzprozessen im offenen Flachgerinnereaktor kam es zur Biofilmbildung auf den Gerinnen, die aus Polyethylen bestanden. Aufgrund der berichteten Reduktion des Einflusses von Scherspannungen auf Mikroalgenzellen in strömenden Fluiden durch Zugabe des wasserlöslichen Polymers Carboxymethylcellulose und des nicht-ionischen Tensids Pluronic F-68 (Camacho *et al.*, 2001; Gallardo Rodríguez *et al.*, 2011) wurden diese Substanzen bei weiteren Satzprozessen in offenen Flachgerinnereaktoren zugesetzt. Mit Carboxymethylcellulose konnte eine Verkürzung der Verzögerungsphase von 5 auf 3 Tage beobachtet werden, die Biofilmbildung wurde nicht reduziert. Durch Zugabe des nicht-ionischen Tensids Pluronic F-68 konnte dagegen eine Biofilmbildung verhindert werden und die maximal erreichte optische Dichte in der Zellsuspension lag mit 3,3 nur knapp unter der im Flachplatten-Photobioreaktor beobachteten  $OD_{750\text{ nm}}$  von 3,9.

Zuletzt wurde die direkte Extraktion von  $\beta$ -Carotin aus Algenbiomasse mit einem einfach rückgewinnbaren Lösemittel untersucht. Dazu wurde zunächst das Lösemittel Ethylacetat in einstufigen Extraktionen durch Mischung in der Schwingmühle mit anschließender Phasentrennung im Zentrifugalfeld als besonders geeignet identifiziert. Dieses nicht mit Wasser mischbare Lösemittel wies eine hohe Selektivität bezüglich  $\beta$ -Carotin auf und extrahierte ohne Zellaufschluss 90 % des vorliegenden  $\beta$ -Carotins. Der fehlende Zellaufschluss und der Verzicht auf die Trocknung der Mikroalgenbiomasse hilft durch geringere Energiekosten die Wertschöpfung des Gesamtprozesses zu erhöhen. Da Ethylacetat zudem als weniger schädlich eingeordnet wird als die anderen untersuchten Lösemittel, wurde es für die folgenden Untersuchungen zur  $\beta$ -Carotin-Extraktion im Zentrifugalextraktor verwendet. Im Zentrifugalextraktor wurden mit Ethylacetat Extraktionsausbeuten von bis zu 80 % direkt aus der wässrigen Zellsuspension bei einem Phasenverhältnis von 1:1 erreicht. Die geringere Stufenausbeute im Zentrifugalextraktor gegenüber der zuvor durchgeführten einstufigen Extraktion mit Schwingmühle und anschließender Phasentrennung im Zentrifugalfeld könnte auf die geringere Kontaktzeit des Lösemittels zurückzuführen sein. Statt 10 min in der Schwingmühle lag die Verweilzeit im Zentrifugalextraktor lediglich bei 1,3-3,2 min. Die Volumenströme der beiden Phasen hatten im untersuchten Bereich keinen Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Zellsuspensionen bis  $6,2\text{ g}_{\text{BTM}}\text{ L}^{-1}$  führten bei der Passage durch den Zentrifugalextraktor nicht zur Emulsionsbildung. Eine Passage durch den Zentrifugalextraktor war ausreichend, da bei einer zweiten Extraktion nur noch < 4 %  $\beta$ -Carotin zusätzlich extrahiert werden konnten.

Da trotz des robusten Wachstums von *D. salina* CCAP19/18 bei dynamischen Klimabedingungen nur vergleichsweise geringe Produktkonzentrationen erzielt werden konnten, scheint dieser Stamm nicht für die  $\beta$ -Carotin-Herstellung geeignet zu sein. Da in dieser Arbeit ein Verfahren für die Charakterisierung von Mikroalgen unter realistischen Klimabedingungen etabliert wurde, wäre es interessant, weitere *D. salina*-Stämme im Hinblick auf ihre  $\beta$ -Carotin Produktionskapazitäten unter gewünschten Klimabedingungen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass *D. salina* CCAP19/18 auch in offenen Flachgerinnereaktoren mit erhöhtem volumetrischen Leistungseintrag Wachstum aufweist. Da trotz des Einsatzes einer Schlauchpumpe statt einer Kreiselpumpe und der Zugabe verschiedener scherprotektiver Agenzien eine deutliche Verlangsamung des Wachstums verglichen mit Satzprozessen in Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren beobachtet wurde, wären der Einsatz einer noch scherärmer fördernden Pumpe und/oder eine Analyse des Flachgerinnereaktorsystems hinsichtlich des Auftretens hoher lokaler Energiedissipationen und deren Beseitigung mögliche Ansatzpunkte, um besonders scherempfindliche Mikroalgen ohne Zellwand in Flachgerinnereaktoren kultivieren zu können. Da verglichen mit den Experimenten in Flachplatten-Gaslift-Photobioreaktoren eine nur unwesentlich niedrigere optische Dichte im Satzprozess im Flachgerinnereaktor mit Schlauchpumpe unter Zugabe des nicht-ionischen Tensids Pluronic F-68 erreicht werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass eine weitere Erhöhung der Biotrockenmassekonzentration durch eine angepasste Nährstoffkonzentration möglich ist.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abu-Ghosh, Said; Fixler, Dror; Dubinsky, Zvy; Iluz, David (2016): Flashing light in microalgae biotechnology (203). In: *Bioresource technology*, S. 357–363.
- Abu-Rezq, Tawfiq S.; Al-Hooti, Suad; Jacob, Dangly A. (2010): Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina* (1). In: *Journal of algal biomass utilization* (2), S. 12–19.
- Aiba, S.; Shoda, M.; Nagatani, M. (1968): Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation (10). In: *Biotechnology and bioengineering* (6), S. 845–864.
- Alcaíno, Jennifer; Baeza, Marcelo; Cifuentes, Víctor (2016): Carotenoid Distribution in Nature. In: Claudia Stange (Hg.): *Carotenoids in Nature*, Bd. 79. Cham: Springer International Publishing (79), S. 3–33.
- Allakhverdiev, Suleyman I.; Murata, Norio (2004): Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (1657). In: *Biochimica et biophysica acta* (1), S. 23–32.
- Allakhverdiev, Suleyman I.; Nishiyama, Yoshitaka; Miyairi, Sachio; Yamamoto, Hiroshi; Inagaki, Noritoshi; Kanesaki, Yu; Murata, Norio (2002): Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in *Synechocystis* (130). In: *Plant physiology* (3), S. 1443–1453.
- Altenbach-Rehm, J.; Nell, Ch.; Arnold, M.; Weuster-Botz, D. (1999): Parallel Bubble Columns with Fed-Batch Technique for Microbial Process Development on a Small Scale (22). In: *Chem. Eng. Technol.* (12), S. 1051–1058.
- Andersen, Robert A. (2013): The Microalgal Cell. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 1–20.
- Andrews, John F. (1968): A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates (10). In: *Biotechnology and bioengineering* (6), S. 707–723.
- Apel, A. C. (2017): Offene Flachgerinnereaktoren zur Massenproduktion von Mikroalgen mit physikalischer Klimasimulation. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Apel, A. C.; Pfaffinger, C. E.; Basedahl, N.; Mittwollen, N.; Göbel, J.; Sauter, J. et al. (2017): Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate (25). In: *Algal Research*, S. 381–390.
- Augustin, J. C.; Brouillaud-Delattre, A.; Rosso, L.; Carlier, V. (2000): Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes* (66). In: *Applied and environmental microbiology* (4), S. 1706–1710.

- Baier, Gretchen (1999): Liquid-liquid extraction based on a new flow pattern: Two-fluid Taylor-Couette flow. PhD Thesis. University of Wisconsin, Madison.
- Barbosa, Maria J.; Wijffels, René H. (2013): Biofuels from Microalgae. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 566–577.
- Behr, Arno; Agar, David W.; Jörissen, Jakob; Vorholt, Andreas J. (2016): Thermische Trennverfahren II (Absorption, Extraktion u. a.). In: Arno Behr, David W. Agar, Jakob Jörissen und Andreas J. Vorholt (Hg.): Einführung in die Technische Chemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 95–108.
- Ben-Amotz, A.; Avron, M. (1983): On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (72). In: *Plant physiology* (3), S. 593–597.
- Ben-Amotz, Ami (1996): Effect of low temperature on the stereoisomer composition of  $\beta$ -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta) (32). In: *J Phycol* (2), S. 272–275.
- Ben-Amotz, Ami (1999): *Dunaliella*  $\beta$ -Carotene. In: Joseph Seckbach (Hg.): Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 399–410.
- Ben-Amotz, Ami; Katz, Adriana; Avron, Mordhay (1982): Accumulation of  $\beta$ -carotene in halotolerant alga: purification and characterization of  $\beta$ -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) (18). In: *J Phycol* (4), S. 529–537.
- Ben-Amotz, Ami; Tornabene, Thomas G.; Thomas, William H. (1985): Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids (21). In: *J Phycol* (1), S. 72–81.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018a): Der Calvin-Zyklus und der Pentosephosphatweg. In: Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto und Lubert Stryer (Hg.): Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 689–721.
- Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; Gatto, Gregory J.; Stryer, Lubert (2018b): Die Lichtreaktionen der Photosynthese. In: Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto und Lubert Stryer (Hg.): Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 661–688.
- Berry, J. A.; Raison, J. K. (1981): Responses of Macrophytes to Temperature. In: O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond und H. Ziegler (Hg.): Physiological Plant Ecology I. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 277–338.
- Bogacz-Radomska, Ludmila; Harasym, Joanna (2018):  $\beta$ -Carotene — properties and production methods (2). In: *Food Quality and Safety* (2), S. 69–74.
- Bonaventura, Celia; Myers, Jack (1969): Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa* (189). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (3), S. 366–383.

- Borovkov, Andrey B.; Gudvilovich, Irina N.; Avsiyan, Anna L.; Memetshaeva, Nakhimov Olga A.; Lelekov, Alexander S.; Novikova, Tatyana M. (2020): Production Characteristics of *Dunaliella salina* at Two-phase Pilot Cultivation (Crimea) (20). In: *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* (5).
- Borowitzka, L. J.; Borowitzka, M. A.; Moulton, T. P. (1984): The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: From laboratory to pilot plant (116-117). In: *Hydrobiologia* (1), S. 115–121.
- Borowitzka, Lesley J.; Borowitzka, Michael A. (1990): Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella Salina* in open ponds (47). In: *Bullet of marine science* (1), S. 244–252.
- Borowitzka, M. A. (2005): Culturing microalgae in outdoor ponds. In: Robert A. Andersen (Hg.): *Algal culturing techniques*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press, S. 205–2018.
- Borowitzka, Michael (2007): Topic 8: Algal Culture and Biotechnology.
- Borowitzka, Michael A. (1999): Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In: *Marine Bioprocess Engineering, Proceedings of an International Symposium organized under auspices of The Working Party on Applied Biocatalysis of the Eurpean Federation of Biotechnology and The European Society for Marine Biotechnology*, Bd. 35: Elsevier (Progress in Industrial Microbiology), S. 313–321.
- Borowitzka, Michael A. (2013): *Dunaliella* : Biology, Production, and Markets. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 359–368.
- Borowitzka, Michael A.; Borowitzka, Lesley J.; Kessly, David (1990): Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina* (2). In: *J Appl Phycol* (2), S. 111–119.
- Borowitzka, Michael A.; Siva, Christopher J. (2007): The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species (19). In: *J Appl Phycol* (5), S. 567–590.
- Borowitzka, Michael Armin; Borowitzka, Lesley J. (Hg.) (1988): *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bottin, Hervé; Lagoutte, Bernard (1992): Ferredoxin and flavodoxin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 (1101). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (1), S. 48–56.
- Boucher, François; van der Rest, Michel; Gingras, Gabriel (1977): Structure and function of carotenoids in the photoreaction center from *Rhodospirillum rubrum* (461). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (3), S. 339–357.
- Bronštejn, Il'ja N.; Semendjaev, Konstantin A. (2006): *Taschenbuch der Mathematik*. 6., vollst. überarb. und erg. Aufl., Nachdruck. Frankfurt am Main: Deutsch.

- Büch, Karen; Stransky, Harald; Hager, Achim (1995): FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O<sub>2</sub>-dependent zeaxanthin-epoxidase (376). In: *FEBS Letters* (1-2), S. 45–48.
- Büchi Labortechnik AG (2016): Rotavapor® R-220 SE. Bedienungsanleitung.
- Camacho, F.García; Grima, E.Molina; Mirón, A.Sánchez; Pascual, V.González; Chisti, Yusuf (2001): Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress (29). In: *Enzyme and Microbial Technology* (10), S. 602–610.
- Cantrell, Keri B.; Ducey, Thomas; Ro, Kyoung S.; Hunt, Patrick G. (2008): Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities (99). In: *Bioresource technology* (17), S. 7941–7953.
- Carvalho, Ana P.; Silva, Susana O.; Baptista, José M.; Malcata, F. Xavier (2011): Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects (89). In: *Applied microbiology and biotechnology* (5), S. 1275–1288.
- Chidambara Murthy, K. N.; Vanitha, A.; Rajesha, J.; Mahadeva Swamy, M.; Sowmya, P. R.; Ravishankar, Gokare A. (2005): In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*-a green microalga (76). In: *Life sciences* (12), S. 1381–1390.
- Chisti, M. Y.; Moo-Young, M. (1987): Airlift reactors: Characteristics, applications and design (60). In: *Chemical Engineering Communications* (1-6), S. 195–242.
- Chisti, Yusuf (2007): Biodiesel from microalgae (25). In: *Biotechnology advances* (3), S. 294–306.
- Chiu, Sheng-Yi; Kao, Chien-Ya; Chen, Chiun-Hsun; Kuan, Tang-Ching; Ong, Seow-Chin; Lin, Chih-Sheng (2008): Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor (99). In: *Bioresource technology* (9), S. 3389–3396.
- Chmiel, Horst (2018): Aufarbeitung (Downstream Processing). In: Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz (Hg.): Bioprozesstechnik. 4. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, S. 299–402.
- Chmiel, Horst; Weuster-Botz, Dirk (2018): Bioreaktoren. In: Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz (Hg.): Bioprozesstechnik. 4. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, S. 157–229.
- Coleman, J. R.; Colman, B. (1981): Inorganic carbon accumulation and photosynthesis in a blue-green alga as a function of external pH (67). In: *Plant physiology* (5), S. 917–921.
- Craft, Neal E.; Soares, Joseph H. (1992): Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and  $\beta$ -carotene in organic solvents (40). In: *J. Agric. Food Chem.* (3), S. 431–434.
- Cunningham, F. X.; Dennenberg, R. J.; Mustardy, L.; Jursinic, P. A.; Gantt, E. (1989): Stoichiometry of Photosystem I, Photosystem II, and Phycobilisomes in the Red Alga *Porphyridium cruentum* as a Function of Growth Irradiance (91). In: *Plant physiology* (3), S. 1179–1187.
- Deshmukh, Sandesh S.; Joshi, Jyeshtharaj B.; Koganti, Sudhir B. (2008): Flow Visualization and Three-Dimensional CFD Simulation of the Annular Region of an Annular Centrifugal Extractor (47). In: *Ind. Eng. Chem. Res.* (10), S. 3677–3686.

- Deshmukh, Sandesh S.; Sathe, Mayur J.; Joshi, Jyeshtharaj B.; Koganti, Sudhir B. (2009): Residence Time Distribution and Flow Patterns in the Single-Phase Annular Region of Annular Centrifugal Extractor (48). In: *Ind. Eng. Chem. Res.* (1), S. 37–46.
- Deshmukh, Sandesh S.; Vedantam, Sreepriya; Joshi, Jyeshtharaj B.; Koganti, Sudhir B. (2007): Computational Flow Modeling and Visualization in the Annular Region of Annular Centrifugal Extractor (46). In: *Ind. Eng. Chem. Res.* (25), S. 8343–8354.
- Doucha, Jiří; Lívanský, Karel (2014): High Density Outdoor Microalgal Culture. In: Rakesh Bajpai, Aleš Prokop und Mark Zappi (Hg.): *Algal Biorefineries*, Bd. 1. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 147–173.
- Dubinsky, Z.; Stambler, N. (2009): Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications (56). In: *Aquat. Microb. Ecol.*, S. 163–176.
- Dubinsky, Zvy; Falkowski, Paul G.; Wyman, Kevin (1986): Light Harvesting and Utilization by Phytoplankton (27). In: *Plant and Cell Physiology* (7), S. 1335–1349.
- Dufossé, Laurent; Galaup, Patrick; Yaron, Anina; Arad, Shoshana Malis; Blanc, Philippe; Chidambara Murthy, Kotamballi N.; Ravishankar, Gokare A. (2005): Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? (16). In: *Trends in Food Science & Technology* (9), S. 389–406.
- Edwards, V. H. (1970): The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics (12). In: *Biotechnology and bioengineering* (5), S. 679–712.
- Falkowski, Paul G.; Dubinsky, Zvy; Wyman, Kevin (1985): Growth-irradiance relationships in phytoplankton (30). In: *Limnol. Oceanogr.* (2), S. 311–321.
- Farhat, Nèjia; Rabhi, Mokded; Falleh, Hanen; Jouini, Jihène; Abdelly, Chedly; Smaoui, Abderrazak (2011): Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) (47). In: *Journal of Phycology* (5), S. 1072–1077.
- Fazeli, M. R.; Tofighi, H.; Samadi, N.; Jamalifar, H.; Fazeli, A. (2006): Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (Lake Urmia isolate) and *Dunaliella salina* (CCAP 19/18 & WT) under stress conditions (14). In: *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* (3), S. 146–150.
- Felix, Hansruedi (1982): Permeabilized cells (120). In: *Analytical Biochemistry* (2), S. 211–234.
- Fisher, M.; Pick, U.; Zamir, A. (1994): A salt-induced 60-kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella* (106). In: *Plant physiology* (4), S. 1359–1365.
- Fisher, Tamar; Berner, Tamar; Iluz, David; Dubinsky, Zvy (1998): The kinetics of the photoacclimation response of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae): a study of changes in ultrastructure and PSU density (34). In: *J Phycol* (5), S. 818–824.

- Flores, M. V.; Voget, C. E.; Ertola, R.J.J. (1994): Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents (16). In: *Enzyme and Microbial Technology* (4), S. 340–346.
- Friedl, Thomas; Rybalka, Nataliya; Kryvenda, Anastasiia (2012): Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. In: Clemens Posten und Christian Walter (Hg.): *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Berlin, Boston: DE GRUYTER.
- Gallardo Rodríguez, J. J.; Sánchez Mirón, A.; García Camacho, F.; Cerón García, M. C.; Belarbi, E. H.; Chisti, Y.; Molina Grima, E. (2011): Carboxymethyl cellulose and Pluronic F68 protect the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* against shear-associated damage (34). In: *Bioprocess and biosystems engineering* (1), S. 3–12.
- Gardner, Robert; Peters, Patrizia; Peyton, Brent; Cooksey, Keith E. (2011): Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta (23). In: *J Appl Phycol* (6), S. 1005–1016.
- Gebauer, K.; Steiner, L.; Hartland, S. (1982): Zentrifugalextraktion - Eine Literaturübersicht (54). In: *Chemie Ingenieur Technik* (5), S. 476–496.
- Gehl, K. A.; Colman, B. (1985): Effect of External pH on the Internal pH of *Chlorella saccharophila* (77). In: *Plant physiology* (4), S. 917–921.
- Godman, James; Balk, Janneke (2008): Genome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the existence of multiple, compartmentalized iron-sulfur protein assembly machineries of different evolutionary origins (179). In: *Genetics* (1), S. 59–68.
- Goldman, Joel C.; Mann, Roger (1980): Temperature-influenced variations in speciation and chemical composition of marine phytoplankton in outdoor mass cultures (46). In: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (1), S. 29–39.
- Gómez, Patricia I.; Barriga, Alejandra; Cifuentes, Ana Silvia; González, Mariela A. (2003): Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta (36). In: *Biological research* (2), S. 185–192.
- Gómez, Patricia I.; González, Mariela A. (2005): The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions (38). In: *Biological research* (2-3), S. 151–162.
- Goss, Reimund; Jakob, Torsten (2010): Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae (106). In: *Photosynthesis research* (1-2), S. 103–122.
- Grand View Research (2016): Beta-Carotene Market Analysis By Source (Algae, Fruits & Vegetables, & Synthetic), By Application (Food & Beverages, Dietary Supplements, Cosmetics, & Animal Feed) And Segment Forecasts To 2024.



- Gregoriades, Niki; Clay, John; Ma, Ningning; Koelling, Kurt; Chalmers, Jeffrey J. (2000): Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow (69). In: *Biotechnology and bioengineering* (2), S. 171–182.
- Griffiths, Melinda J.; Garcin, Clive; van Hille, Robert P.; Harrison, Susan T. L. (2011): Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density (85). In: *Journal of microbiological methods* (2), S. 119–123.
- Grobbelaar, Johan U. (2010): Microalgal biomass production: challenges and realities (106). In: *Photosynthesis research* (1-2), S. 135–144.
- Grobbelaar, Johan U. (2013): Inorganic Algal Nutrition. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 123–133.
- Gualtieri, Paolo; Barsanti, L. (2006): Algae. Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Hager, A. (1967a): Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen xanthophyllumwandlungen an *Chlorella* und *Spinacia* (74). In: *Planta* (2), S. 148–172.
- Hager, A. (1967b): Untersuchungen über die Rückreaktionen im Xanthophyll-Cyclus bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus* (76). In: *Planta* (2), S. 138–148.
- Hager, A. (1969): Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin→ Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung (89). In: *Planta* (3), S. 224–243.
- Hallenbeck, Patrick C.; Grogger, Melanie; Mraz, Megan; Veverka, Donald (2015): The use of Design of Experiments and Response Surface Methodology to optimize biomass and lipid production by the oleaginous marine green alga, *Nannochloropsis gaditana* in response to light intensity, inoculum size and CO<sub>2</sub> (184). In: *Bioresource technology*, S. 161–168.
- Han, Danxiang; Li, Yantao; Hu, Qiang (2013): Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 388–405.
- Hannon, Michael; Gimpel, Javier; Tran, Miller; Rasala, Beth; Mayfield, Stephen (2010): Biofuels from algae: challenges and potential (1). In: *Biofuels* (5), S. 763–784.
- Havel, Jan (2006): Asymmetrische Synthesen mit phototrophen Mikroorganismen. Dissertation. Technical University Munich, Munich.
- Heath, Carole; Kiss, Robert (2007): Cell culture process development: advances in process engineering (23). In: *Biotechnology progress* (1), S. 46–51.

- Hejazi, M.; Wijffels, R. H. (2003): Effect of light intensity on  $\beta$ -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors (20). In: *Biomolecular Engineering* (4-6), S. 171–175.
- Hejazi, M. A.; Lamarliere, C. de; Rocha, J. M. S.; Vermuë, M.; Tramper, J.; Wijffels, R. H. (2002): Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability (79). In: *Biotechnology and bioengineering* (1), S. 29–36.
- Heldt, Hans Walter; Piechulla, Birgit (2015): 3 Die Photosynthese ist ein Elektronentransportprozess. In: Hans Walter Heldt und Birgit Piechulla (Hg.): *Pflanzenbiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 65–109.
- Hu, Qiang (2013): Environmental Effects on Cell Composition. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 114–122.
- Hu, Qiang; Sommerfeld, Milton; Jarvis, Eric; Ghirardi, Maria; Posewitz, Matthew; Seibert, Michael; Darzins, Al (2008): Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances (54). In: *The Plant Journal* (4), S. 621–639.
- Hummel, Werner; Kula, Maria-Regina (1989): Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts (9). In: *Journal of microbiological methods* (3), S. 201–209.
- Janssen, Marcel; Slenders, Peter; Tramper, Johannes; Mur, Luuc R.; Wijffels, RenéH. (2001): Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles (29). In: *Enzyme and Microbial Technology* (4-5), S. 298–305.
- Jaouen, P.; Vandanjon, L.; Quéméneur, F. (1999): The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps (68). In: *Bioresource technology* (2), S. 149–154.
- Karube, I.; Takeuchi, T.; Barnes, D. J. (1992): Biotechnological reduction of CO<sub>2</sub> emissions. In: A. Fiechter (Hg.): *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Bd. 46. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag (46), S. 63–79.
- Keren, N.; Berg, A.; van Kan, P. J.; Levanon, H.; Ohad, I. (1997): Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow (94). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), S. 1579–1584.
- Khadim, Sk Riyazat; Singh, Prabhakar; Singh, Ankit Kumar; Tiwari, Anupam; Mohanta, Abhishek; Asthana, Ravi Kumar (2018): Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting (270). In: *Bioresource technology*, S. 20–29.
- Khan, Muhammad Imran; Shin, Jin Hyuk; Kim, Jong Deog (2018): The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products (17). In: *Microbial cell factories* (1), S. 36.

- Kim, Wonduck; Park, Jang Min; Gim, Geun Ho; Jeong, Sang-Hwa; Kang, Chang Min; Kim, Duk-Jin; Kim, Si Wouk (2012): Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae (35). In: *Bioprocess and biosystems engineering* (1-2), S. 19–27.
- Kokkinos, Dimitrios; Dakhil, Haider; Wierschem, Andreas; Briesen, Heiko; Braun, André (2016): Deformation and rupture of *Dunaliella salina* at high shear rates without the use of thickeners (53). In: *Biorheology* (1), S. 1–11.
- Koller, Anja Pia (2017): Reaktionskinetik des lichtabhängigen Wachstums von *Scenedesmus spec.* in Flachplattenphotobioreaktoren. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Koller, Anja Pia; Löwe, Hannes; Schmid, Verena; Mundt, Sabine; Weuster-Botz, Dirk (2017): Model-supported phototrophic growth studies with *Scenedesmus obtusiusculus* in a flat-plate photobioreactor (114). In: *Biotechnology and bioengineering* (2), S. 308–320.
- Kumar, Dhanesh; Kastanek, Petr; Adhikary, Siba P. (2018): Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application (115). In: *Current Science* (2), S. 234.
- Kurzrock, Tanja (2010): Integrierte Reaktivextraktion zur Gewinnung von biotechnologisch hergestellter Bernsteinsäure. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Lamers, Packo P.; Janssen, Marcel; Vos, Ric C. H. de; Bino, Raoul J.; Wijffels, René H. (2012): Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga (162). In: *Journal of Biotechnology* (1), S. 21–27.
- Lamers, Packo P.; van de Laak, Carlien C. W.; Kaasenbrood, Petrouchka S.; Lorier, Jeroen; Janssen, Marcel; Vos, Ric C. H. de et al. (2010): Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina* (106). In: *Biotechnology and bioengineering* (4), S. 638–648.
- Law, Sam Q. K.; Mettu, Srinivas; Ashokkumar, Muthupandian; Scales, Peter J.; Martin, Gregory J. O. (2018): Emulsifying properties of ruptured microalgae cells: Barriers to lipid extraction or promising biosurfactants? (170). In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, S. 438–446.
- Lee, Robert Edward (2008): Phycology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lee, Yuan-Kun; Chen, Wei; Shen, Hui; Han, Danxiang; Li, Yantao; Jones, Howland D. T. et al. (2013): Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 37–68.
- Leonard, R. A.; Bernstein, G. J.; Ziegler, A. A.; Pelto, R. H. (1980): Annular Centrifugal Contactors for Solvent Extraction (15). In: *Separation Science and Technology* (4), S. 925–943.

- Li, Yantao; Han, Danxiang; Sommerfeld, Milton; Hu, Qiang (2011): Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions (102). In: *Bioresource technology*, 01.01.2011 (1), S. 123–129.
- Liu, Bei-Hui; Lee, Yuan-Kun (2000): Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. (12). In: *J Appl Phycol* (3/5), S. 301–307.
- Liu, Jin; Chen, Feng (2016): Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. In: Clemens Posten und Steven Feng Chen (Hg.): *Microalgae Biotechnology*, Bd. 153. 1st ed. 2016. Cham, s.l.: Springer International Publishing (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 153), S. 1–35.
- Loeblich, Laurel A. (1982): Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta) (62). In: *J. Mar. Biol. Ass.* (3), S. 493–508.
- Lohrengel, Burkhard (2012): Einführung in die thermischen Trennverfahren. Trennung von Gas-, Dampf- und Flüssigkeitsgemischen. 2., überarb. Aufl. München: Oldenbourg.
- Marín, Nellis; Morales, Francisco; Lodeiros, César; Tamigneaux, Eric (1998): Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities (10). In: *J Appl Phycol* (4), S. 405–411.
- Marks, David M. (2003): Equipment design considerations for large scale cell culture (42). In: *Cytotechnology* (1), S. 21–33.
- Masojídek, Jiří; Torzillo, Giuseppe; Koblížek, Michal (2013): Photosynthesis in Microalgae. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 21–36.
- Mata, Teresa M.; Martins, António A.; Caetano, Nidia. S. (2010): Microalgae for biodiesel production and other applications: A review (14). In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (1), S. 217–232.
- McKay, R. Michael L.; La Roche, Julie; Yakunin, Alexander F.; Durnford, Dion G.; Geider, Richard J. (1999): Accumulation of ferredoxin and flavodoxin in a marine diatom in response to Fe (35). In: *J Phycol* (3), S. 510–519.
- Meikrantz, D. H.; Meikrantz, S. B.; Macaluso, L. L. (2001): Annular centrifugal contactors for multiple stage extraction processes (188). In: *Chemical Engineering Communications* (1), S. 115–127.
- Michalak, Izabela; Chojnacka, Katarzyna (2015): Algae as production systems of bioactive compounds (15). In: *Eng. Life Sci.* (2), S. 160–176.
- Michelon, Mariano; Matos Borba, Thais de; Da Silva Rafael, Ruan; Burkert, Carlos André Veiga; Medeiros Burkert, Janaína Fernandes de (2012): Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*:

- A comparison between different techniques of cell disruption (21). In: *Food Sci Biotechnol* (1), S. 1–8.
- Michels, Michiel H. A.; van der Goot, Atze Jan; Vermuë, Marian H.; Wijffels, René H. (2016): Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump (28). In: *J Appl Phycol* (1), S. 53–62.
- Millero, Frank; Huang, Fen; Graham, Taylor; Pierrot, Denis (2007): The dissociation of carbonic acid in NaCl solutions as a function of concentration and temperature (71). In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* (1), S. 46–55.
- Mishra, Avinash; Jha, Bhavanath (2009): Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress (100). In: *Bioresource technology* (13), S. 3382–3386.
- Mishra, Avinash; Kavita, Kumari; Jha, Bhavanath (2011): Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae *Dunaliella salina* (83). In: *Carbohydrate Polymers* (2), S. 852–857.
- Moheimani, Navid Reza; Borowitzka, Michael A. (2007): Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds (96). In: *Biotechnology and bioengineering* (1), S. 27–36.
- Mojaat, M.; Pruvost, J.; Foucault, A.; Legrand, J. (2008): Effect of organic carbon sources and Fe<sup>2+</sup> ions on growth and β-carotene accumulation by *Dunaliella salina* (39). In: *Biochemical Engineering Journal* (1), S. 177–184.
- Mollet, Mike; Ma, Ningning; Zhao, Yang; Brodkey, Robert; Taticek, Ron; Chalmers, Jeffrey J. (2004): Bioprocess equipment: characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells (20). In: *Biotechnology progress* (5), S. 1437–1448.
- Monte, Joana; Bernardo, Jorge; Sá, Marta; Parreira, Celina; Galinha, Cláudia F.; Costa, Luís et al. (2020): Development of an integrated process of membrane filtration for harvesting carotenoid-rich *Dunaliella salina* at laboratory and pilot scales (233). In: *Separation and Purification Technology*, S. 116021.
- Morowvat, Mohammad Hossein; Ghasemi, Younes (2016): Culture medium optimization for enhanced β-carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture (7). In: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, S. 217–223.
- Murata, Norio (1969): Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum* (172). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (2), S. 242–251.

- Murata, Norio; Takahashi, Shunichi; Nishiyama, Yoshitaka; Allakhverdiev, Suleyman I. (2007): Photoinhibition of photosystem II under environmental stress (1767). In: *Biochimica et biophysica acta* (6), S. 414–421.
- Myers, J.; Graham, J. R. (1959): On the Mass Culture of Algae. II. Yield as a Function of Cell Concentration Under Continuous Sunlight Irradiance (34). In: *Plant physiology* (3), S. 345–352.
- Nash, Diane; Miyao, Mitsue; Murata, Norio (1985): Heat inactivation of oxygen evolution in Photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese (807). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (2), S. 127–133.
- Nguyen, Suong; Tran, Duc; Portilla, Sixto; Vo, Truong (2014): Medium improvement for higher growth and longer stationary phase of *Dunaliella* (2). In: *Journal of Plant Sciences* (1), S. 9–13.
- Nishida, I.; Murata, N. (1996): Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids (47). In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, S. 541–568.
- Nishiyama, Yoshitaka; Allakhverdiev, Suleyman I.; Yamamoto, Hiroshi; Hayashi, Hidenori; Murata, Norio (2004): Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (43). In: *Biochemistry* (35), S. 11321–11330.
- Nonomura, Arthur M. (1987): Process for producing a naturally-derived carotene/oil composition by direct extraction from algae. Microbio Resoures, Inc. (US4680314A). Online verfügbar unter <https://patents.google.com/patent/US4680314A/en>, zuletzt aktualisiert am 22.11.2020, zuletzt geprüft am 22.11.2020.
- Oliveira, Luis; Bisalputra, Thana; Antia, Naval J. (1980): Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments (85). In: *New Phytol* (3), S. 385–392.
- Orset, Sandra; Young, Andrew J. (1999): Low-temperature-induced synthesis of  $\alpha$ -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) (35). In: *J Phycol* (3), S. 520–527.
- Panesar, Reeba; Panesar, Parmjit S.; Singh, Ram S.; Kennedy, John F.; Bera, Manav B. (2007): Production of lactose-hydrolyzed milk using ethanol permeabilized yeast cells (101). In: *Food Chemistry* (2), S. 786–790.
- Pfaffinger, Christina Evi (2017): Reaktionstechnische Untersuchungen zur Lipidherstellung mit *Nannochloropsis* sp. in verschiedenen Photobioreaktoren. Dissertation. Technische Universität München, München. Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Pfaffinger, Christina Evi; Schöne, Dennis; Trunz, Sascha; Löwe, Hannes; Weuster-Botz, Dirk (2016): Model-based optimization of microalgae areal productivity in flat-plate gas-lift photobioreactors (20). In: *Algal Research*, S. 153–163.

- Pfaffinger, Christina Evi; Severin, Timm Steffen; Apel, Andreas Christoph; Göbel, Johanna; Sauter, Julia; Weuster-Botz, Dirk (2019): Light-dependent growth kinetics enable scale-up of well-mixed phototrophic bioprocesses in different types of photobioreactors (297). In: *Journal of Biotechnology*, S. 41–48.
- Pisal, Dipak S.; Lele, S. S. (2005): Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina* (4). In: *Indian Journal of Biotechnology*, S. 476–483.
- Posten, Clemens; Walter, Christian (Hg.) (2012): *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Berlin, Boston: DE GRUYTER.
- Prieto, Ana; Pedro Cañavate, J.; García-González, Mercedes (2011): Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes (151). In: *Journal of Biotechnology* (2), S. 180–185.
- Pruvost, Jérémy; Cornet, Jean-François (2012): Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors. In: Clemens Posten und Christian Walter (Hg.): *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. Berlin, Boston: DE GRUYTER.
- Pulz, Otto; Gross, Wolfgang (2004): Valuable products from biotechnology of microalgae (65). In: *Applied microbiology and biotechnology* (6), S. 635–648.
- Quinn, Jason; Winter, Lenneke de; Bradley, Thomas (2011): Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems (102). In: *Bioresource technology* (8), S. 5083–5092.
- Raven, John A.; Geider, Richard J. (1988): Temperature and algal growth (110). In: *New Phytol* (4), S. 441–461.
- Reinman, Sally; Mathis, Paul (1981): Influence of temperature on Photosystem II electron transfer reactions (635). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (2), S. 249–258.
- Reynolds, H. L.; Pacala, S. W. (1993): An analytical treatment of root-to-shoot ratio and plant competition for soil nutrient and light (141). In: *The American naturalist* (1), S. 51–70.
- Richmond, Amos (2013): *Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae*. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): *Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology*. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 169–204.
- Robinson, T.; Aboaba, O. O.; Ocio, M. J.; Baranyi, J.; Mackey, B. M. (2001): The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes* (70). In: *International Journal of Food Microbiology* (1-2), S. 163–173.
- Roopnarain, A.; Gray, V. M.; Sym, S. D. (2014): Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production (156). In: *Bioresource technology*, S. 408–411.

- Rosas-Saavedra, Carolina; Stange, Claudia (2016): Biosynthesis of Carotenoids in Plants: Enzymes and Color. In: Claudia Stange (Hg.): Carotenoids in Nature, Bd. 79. Cham: Springer International Publishing (79), S. 35–69.
- Rose, Peter Dale; Phillips, Trevor Davis; Sanderson, Ronald Douglas (1994): Solvent extraction of beta-carotene. Sasol Chemical Industries (EP0612725B1). Online verfügbar unter <https://patents.google.com/patent/EP0612725B1/en>, zuletzt aktualisiert am 22.11.2020, zuletzt geprüft am 22.11.2020.
- Rosello Sastre, Rosa (2012): Products from microalgae: An overview. In: Clemens Posten und Christian Walter (Hg.): Microalgal Biotechnology: Integration and Economy. 1. Aufl. s.l.: Walter de Gruyter GmbH Co.KG.
- Rüegg, Rudolf (1984): Extraction process for beta-carotene - Google Patents. Hoffmann-La Roche Inc. (US4439629A). Online verfügbar unter <https://patents.google.com/patent/US4439629A/en>, zuletzt aktualisiert am 22.11.2020, zuletzt geprüft am 22.11.2020.
- Rüffer, Nicole (2004): Fermentative Produktion von L-Phenylalanin mit *Escherichia coli* und integrierter Produktabtrennung. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig.
- Saha, Sushanta Kumar; Moane, Siobhan; Murray, Patrick (2013): Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18 (147). In: *Bioresource technology*, S. 23–28.
- Santos, A. M.; Janssen, M.; Lamers, P. P.; Evers, W. A. C.; Wijffels, R. H. (2012): Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions (104). In: *Bioresource technology*, S. 593–599.
- Schenk, Peer M.; Thomas-Hall, Skye R.; Stephens, Evan; Marx, Ute C.; Mussgnug, Jan H.; Posten, Clemens et al. (2008): Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production (1). In: *Bioenerg. Res.* (1), S. 20–43.
- Schmidt, Werner (2000): Optische Spektroskopie. Eine Einführung. D-69451 Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Schönbucher, Axel (2002): Extraktion. In: Axel Schönbucher (Hg.): Thermische Verfahrenstechnik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 610–766.
- Schröder, M.; Müller, C.; Posten, C.; Deckwer, W.-D.; Hecht, V. (1997): Inhibition kinetics of phenol degradation from unstable steady-state data (54). In: *Biotechnology and bioengineering* (6), S. 567–576.
- Schügerl, Karl (1994): Extraction Equipment. In: Karl Schügerl (Hg.): Solvent Extraction in Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 52–65.



- Schütte, Horst; Kula, Maria-Regina (1988): Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill (10). In: *Enzyme and Microbial Technology* (9), S. 552–558.
- Schuur, Boelo; Kraai, Gerard N.; Winkelman, Jozef G.M.; Heeres, Hero J. (2012): Hydrodynamic features of centrifugal contactor separators: Experimental studies on liquid hold-up, residence time distribution, phase behavior and drop size distributions (55). In: *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, S. 8–19.
- Severin, Timm Steffen; Plamauer, Sebastian; Apel, Andreas Christoph; Brück, Thomas; Weuster-Botz, Dirk (2017): Rapid salinity measurements for fluid flow characterisation using minimal invasive sensors (166). In: *Chemical Engineering Science*, S. 161–167.
- Sha, Yujun; Fritz, Jochen; Klemm, Toni; Ripperger, Siegfried (2016): Untersuchung der Strömung im Taylor-Couette-System bei geringen Spaltbreiten (88). In: *Chemie Ingenieur Technik* (5), S. 640–647.
- Shaker, Saeedeh; Morowvat, Mohammad Hossein; Ghasemi, Younes (2017): Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth,  $\beta$ -carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina* (9). In: *JYP* (1), S. 43–46.
- Silva, Humberto J.; Cortifas, Teresa; Ertola, Rodolfo J. (1987): Effect of hydrodynamic stress on *Dunaliella* growth (40). In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1), S. 41–49.
- Singh, S. P.; Singh, Priyanka (2015): Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review (50). In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, S. 431–444.
- Soeder, Carl J. (1971): Mikroalgenkultur im technischen Maßstab (1). In: *Biologie in unserer Zeit* (5), S. 133–142.
- Somkuti, G. A.; Dominiacki, M. E.; Steinberg, D. H. (1998): Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with ethanol (36). In: *Current microbiology* (4), S. 202–206.
- Takors, Ralf; Weuster-Botz, Dirk (2018): Prozessmodelle. In: Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz (Hg.): *Bioprozesstechnik*. 4. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, S. 71–105.
- Tamhane, Tushar V.; Joshi, Jyeshtharaj B.; Kamachi Mudali, U.; Natarajan, R.; Patil, R. N. (2012): Axial mixing in annular centrifugal extractors (207-208). In: *Chemical Engineering Journal*, S. 462–472.
- Tamman, Amel A.; Fakhry, Eman M.; El-Sheekh, Mostafa (2011): Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* (10). In: *African Journal of Biotechnology* (19).
- Tharmalingam, T.; Ghebeh, H.; Wuerz, T.; Butler, M. (2008): Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells (39). In: *Molecular biotechnology* (2), S. 167–177.
- Thompson, Guy A. (1996): Lipids and membrane function in green algae (1302). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* (1), S. 17–45.

- Tiburcio, P. C.; Galvez, F. C. F.; Cruz, L. J.; Gavino, V. C. (2007): Optimization of low-cost drying methods to minimize lipid peroxidation in *Spirulina platensis* grown in the Philippines (19). In: *J Appl Phycol* (6), S. 719–726.
- Torzillo, Giuseppe; Vonshak, Avigad (2013): Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 90–113.
- Tredici, Mario R. (2010): Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution (1). In: *Biofuels* (1), S. 143–162.
- Tredici, Mario R.; Chini Zittelli, Graziella; Rodolfi, Liliana (2010): Photobioreactors. In: Michael C. Flickinger (Hg.): Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Umweltbundesamt (2020): Berichterstattung unter der Klimarahmenkonvention der Vereinten Nationen und dem Kyoto-Protokoll 2020. Nationaler Inventarbericht zum Deutschen Treibhausgasinventar 1990 - 2018. In: *Climate Change* (22).
- Uquiche, Edgar; Antilaf, Ivette; Millao, Sonia (2016): Enhancement of pigment extraction from *B. braunii* pretreated using CO<sub>2</sub> rapid depressurization (47). In: *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* (2), S. 497–505.
- van den Hoeck, Christiaan; Jahns, Hans Martin; Mann, David G. (1993): Algen. 3., Neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Vass, I.; Styring, S.; Hundal, T.; Koivuniemi, A.; Aro, E.; Andersson, B. (1992): Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation (89). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (4), S. 1408–1412.
- Vedantam, S.; Joshi, J. B. (2006): Annular Centrifugal Contactors—A Review (84). In: *Chemical Engineering Research and Design* (7), S. 522–542.
- Wang, Bei; Li, Yanqun; Wu, Nan; Lan, Christopher Q. (2008): CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae (79). In: *Applied microbiology and biotechnology* (5), S. 707–718.
- Wardle, Kent E.; Allen, Todd R.; Swaney, Ross (2009): CFD Simulation of the Separation Zone of an Annular Centrifugal Contactor (44). In: *Separation Science and Technology* (3), S. 517–542.
- Waterbury, John B.; Stanier, Roger Y. (1981): Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments. In: Mortimer P. Starr, Heinz Stolp, Hans G. Trüper, Albert Balows und Hans G. Schlegel (Hg.): The prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 221–223.
- Webb, John Leyden (1963): Enzyme and metabolic inhibitors. New York: Academic Press.

- Wellburn, Alan R. (1994): The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution (144). In: *Journal of Plant Physiology* (3), S. 307–313.
- Weuster-Botz, D.; Altenbach-Rehm, Jutta (1996): Vorrichtung zur Serien-Kultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen am 03.08.1996. Anmeldenr: PCT/DE96/01485. Veröffentlichungsnr: EP0845029B1.
- Weuster-Botz, Dirk (1999): Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Habil.-Schr., 1999. Jülich: Forschungszentrum Jülich Zentralbibliothek (Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences, 2).
- Weuster-Botz, Dirk; Altenbach-Rehm, J.; Hawrylenko, A. (2001): Process-engineering characterization of small-scale bubble columns for microbial process development (24). In: *Bioprocess and biosystems engineering* (1), S. 3–11.
- Weuster-Botz, Dirk; Takors, Ralf (2018): Wachstumskinetik. In: Horst Chmiel, Ralf Takors und Dirk Weuster-Botz (Hg.): *Bioprozesstechnik*. 4. Auflage. Berlin: Springer Spektrum, S. 45–70.
- Wijffels, René H.; Barbosa, Maria J. (2010): An outlook on microalgal biofuels (329). In: *Science (New York, N.Y.)* (5993), S. 796–799.
- Wollman, F. A. (2001): State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus (20). In: *The EMBO journal* (14), S. 3623–3630.
- Wongnansilp, Tassnapa; Juntawong, Niran; Wu, Zhe (2016): Effects of phosphorus on the growth and chlorophyll fluorescence of a *Dunaliella salina* strain isolated from saline soil under nitrate limitation (89). In: *J Biol Res* (2).
- Woortman, Dirk Volker; Jürgens, Sophie; Untergehrer, Martin; Rechenberger, Julia; Fuchs, Monika; Mehmer, Norbert et al. (2020): Greener aromatic antioxidants for aviation and beyond (4). In: *Sustainable Energy Fuels* (5), S. 2153–2163.
- World Meteorological Organization (2019): WMO Greenhouse Gas Bulletin (GHG Bulletin) - No. 15: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2018 (15).
- Wu, Zhe; Dejtsakdi, Wipawee; Kermanee, Prasart; Ma, Chunhong; Arirob, Wallop; Sathasivam, Ramaraj; Juntawong, Niran (2017): Outdoor cultivation of *Dunaliella salina* KU 11 using brine and saline lake water with raceway ponds in northeastern Thailand (64). In: *Biotechnology and applied biochemistry* (6), S. 938–943.
- Wu, Zhe; Duangmanee, Promchup; Zhao, Pu; Juntawong, Niran; Ma, Chunhong (2016): The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil (9). In: *Jundishapur journal of microbiology* (1), e26732.

- Xu, Yanan; Ibrahim, Iskander M.; Harvey, Patricia J. (2016): The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30 (106). In: *Plant physiology and biochemistry : PPB*, S. 305–315.
- Yano, Toshimasa; Koga, Shozo (1969): Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition (11). In: *Biotechnology and bioengineering* (2), S. 139–153.
- Ye, Zhi-Wei; Jiang, Jian-Guo; Wu, Guang-Hong (2008): Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects (26). In: *Biotechnology advances* (4), S. 352–360.
- Ying, Kezhen (2014): Effects of CO<sub>2</sub> and pH on Growth of the Microalga *Dunaliella salina* (06). In: *J Microb Biochem Technol* (03).
- Zhu, Yue-Hui; Jiang, Jian-Guo (2008): Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene (227). In: *Eur Food Res Technol* (3), S. 953–959.
- Zittelli, Graziella C.; Biondi, Natascia; Rodolfi, Liliana; Tredici, Mario R. (2013): Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 225–266.
- Zmora, Oded; Grosse, Daniel J.; Zou, Ning; Samocha, Tzachi M. (2013): Microalga for Aquaculture: Practical Implications. In: Amos Richmond und Qiang Hu (Hg.): Handbook of microalgal culture. Applied phycology and biotechnology. 2. ed., [completely rev., updated and enl. ed., elektronische Ressource]. Hoboken, NJ, Chichester: Wiley; Wiley-Blackwell, S. 628–652.

## Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung                       | Bedeutung  |
|---------------------------------|--|
| 4Fe-4S                          | Eisen-Schwefel-Cluster                             |
| A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> | Elektronenakzeptoren von P700                      |
| ATP                             | Adenosintriphosphat                                |
| BCH                             | Carotinoid-β-Hydroxylase                           |
| BCH1                            | β-Carotin-Hydroxylase                              |
| BCH2                            | β-Carotin-Hydroxylase                              |
| BG11                            | Medium für blaugüne Algen                          |
| BTM                             | Biotrockenmasse                                    |
| CCAP                            | Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland |
| CHYE                            | Carotinoid-ε-Hydroxylase                           |
| CO <sub>2</sub>                 | Kohlenstoffdioxid                                  |
| CRTISO                          | Carotinoidisomerase                                |
| Cyt <i>bf</i>                   | Cytochrom <i>b<sub>6</sub>f</i> -Komplex           |
| <i>D. salina</i>                | <i>Dunaliella salina</i>                           |
| DNA                             | Desoxyribonukleinsäure                             |
| e <sup>-</sup>                  | Elektron   |
| FD                              | Ferredoxin   |
| FNR                             | Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase            |
| GGPP                            | Geranylgeranylphosphat                             |
| H <sup>+</sup>                  | Proton   |
| H <sub>2</sub> O                | Wasser   |
| LCYB                            | β-Lycopincyclase                                   |
| LCYE                            | ε-Lycopincyclase                                   |
| LED                             | Leuchtdiode  |
| Mn                              | Mangan   |
| <i>N. salina</i>                | <i>Nannochloropsis salina</i>                      |
| NADPH                           | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat               |
| NL                              | Normliter  |
| NSY                             | Neoxanthinsynthase                                 |
| O <sub>2</sub>                  | Sauerstoff   |
| P680                            | Photosystem II                                     |
| P700                            | Photosystem I                                      |
| PC                              | Plastocyanin                                       |
| PDS                             | Phytoendesaturase                                  |
| PE-HD                           | Polyethylen hoher Dichte                           |
| Ph                              | Phäophytin   |
| pH                              | potentia hydrogenii                                |
| P <sub>i</sub>                  | Phosphat   |
| P <sub>max</sub>                | maximale Photosyntheserate                         |

| Abkürzung        | Bedeutung  |
|------------------|--|
| pO <sub>2</sub>  | Sauerstoffpartialdruck                             |
| PQ               | Plastochinon                                       |
| PQH <sub>2</sub> | Plastochinol                                       |
| PS               | Photosystem  |
| PSY              | Phytoensynthase                                    |
| PTFE             | Polytetrafluorethylen                              |
| R <sub>d</sub>   | Dunkelrespiration                                  |
| RNA              | Ribonukleinsäure                                   |
| SAG              | Sammlung von Algenkulturen - Universität Göttingen |
| Z                | Tyrosinrest  |
| ZDS              | ζ-Carotin-Desaturase                               |
| ZEP              | Zeaxanthin-Epoxidase                               |
| Z-ISO            | ζ-Carotin-Isomerase                                |

| Symbol           | Bedeutung  | Einheit                              |
|------------------|--|--------------------------------------|
| A <sub>Q</sub>   | Querschnittsfläche Reaktor   | m <sup>2</sup>                       |
| A <sub>λ</sub>   | Absorption bei Wellenlänge λ   | -                                    |
| c <sub>a</sub>   | Konzentration an Chlorophyll <i>a</i>                                  | mg L <sup>-1</sup>                   |
| c <sub>b</sub>   | Konzentration an Chlorophyll <i>b</i>                                  | mg L <sup>-1</sup>                   |
| c <sub>E</sub>   | Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt                            | g L <sup>-1</sup>                    |
| c <sub>L</sub>   | Lichtgeschwindigkeit (2,997 · 10 <sup>8</sup> )                        | m s <sup>-1</sup>                    |
| c <sub>R</sub>   | Konzentration des Extraktstoffes im Raffinat                           | g L <sup>-1</sup>                    |
| c <sub>S</sub>   | Substratkonzentration  | g L <sup>-1</sup>                    |
| c <sub>X</sub>   | Biotrockenmassekonzentration   | g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>     |
| c <sub>X,0</sub> | Anfangskonzentration der Biotrockenmasse                               | g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>     |
| d                | Spaltbreite  | m                                    |
| d <sub>B</sub>   | mittlerer Blasendurchmesser  | m                                    |
| E                | Energie eines Photons  | J                                    |
| f                | Frequenz   | s <sup>-1</sup>                      |
| f <sub>X</sub>   | Korrelationsfaktor zwischen Biomassekonzentration und optischer Dichte | g <sub>BTM</sub> L <sup>-1</sup>     |
| g                | Erdbeschleunigung (9,81)   | m s <sup>-2</sup>                    |
| H                | Höhe der Flüssigkeitssäule   | m                                    |
| h                | Planck'sches Wirkungsquantum (6,626 · 10 <sup>-34</sup> )              | J s                                  |
| h <sub>F</sub>   | Höhe der unbegasten Flüssigkeitssäule                                  | m                                    |
| I                | Bestrahlungsstärke   | μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |
| I*               | mittlere integrale Photonenflussdichte zu einem Zeitpunkt              | μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |
| I**              | mittlere integrale Photonenflussdichte über einen Zeitraum             | μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |
| I <sub>0</sub>   | Eingangspotonenflussdichte   | μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> |

| Symbol             | Bedeutung   | Einheit  |
|--------------------|---|--|
| $I_c$              | Bestrahlungsstärke am Kompensationspunkt                    | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   |
| $I_i$              | Bestrahlungsstärke am Inhibitionspunkt                      | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   |
| $I_k$              | Bestrahlungsstärke am Übergang von Limitierung zu Sättigung | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   |
| $I_s$              | Bestrahlungsstärke am Sättigungspunkt                       | $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   |
| $K_E$              | Verteilungskoeffizient                                      | -  |
| $K_I$              | Inhibierungskonstante des Substrates                        | $\text{g L}^{-1}$  |
| $K_S$              | Sättigungskonstante des Substrates                          | $\text{g L}^{-1}$  |
| $l$                | Schichtdicke  | cm   |
| $L$                | maximale Schichtdicke                                       | cm   |
| $m$                | Masse   | g  |
| $m_s$              | zellspezifische Aufnahme-<br>(Erhaltungsstoffwechsel)       | $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  |
| $OD_\lambda$       | optische Dichte bei Wellenlänge $\lambda$                   | -  |
| $P$                | Leistung  | W  |
| $p$                | Druck   | bar/Pa   |
| $R$                | universelle Gaskonstante                                    | $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$  |
| $RZA$              | Raum-Zeit-Ausbeute  | $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$                            |
| $S$                | Selektivität  | -  |
| $T$                | Temperatur  | K  |
| $t$                | Zeit  | h/d  |
| $Ta$               | Taylorzahl  | -  |
| $V$                | Volumen   | $\text{m}^3/\text{L}$  |
| $V_M$              | molares Volumen des idealen Gases ( $22,41 \cdot 10^{-3}$ ) | $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$   |
| $\dot{V}_M$        | molarer Volumenstrom  | $\text{mol s}^{-1}$  |
| $w$                | Gasleerrohrgeschwindigkeit                                  | $\text{m s}^{-1}$  |
| $Y_{X,S,\mu}$      | Ertragskoeffizient  | $\text{g g}^{-1}$  |
| $\beta$            | empirische Konstante nach Webb                              | -  |
| $\epsilon$         | Extinktionskoeffizient                                      | $\text{L}^{0,5} \text{g}^{-0,5} \text{cm}^{-1}/\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ |
| $\eta$             | Verhältnis der Radien                                       | -  |
| $\vartheta$        | Drehzahlverhältnis  | -  |
| $\lambda$          | Wellenlänge   | m  |
| $\mu$              | spezifische Wachstumsrate                                   | $\text{h}^{-1}/\text{d}^{-1}$  |
| $\mu_{\text{max}}$ | maximale Wachstumsrate                                      | $\text{h}^{-1}/\text{d}^{-1}$  |
| $\nu$              | kinematische Viskosität                                     | $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$   |
| $\rho_F$           | Dichte  | $\text{kg m}^{-3}$   |
| $\sigma_G$         | Grenzflächenspannung  | $\text{N m}^{-1}$  |
| $\varphi$          | Sensitivitätsfaktor nach Pfaffinger                         | -  |
| $\Omega_i$         | Winkelgeschwindigkeit innerer Zylinder                      | $\text{s}^{-1}$  |

## Anhang

### A.1. Dissoziationskonstanten

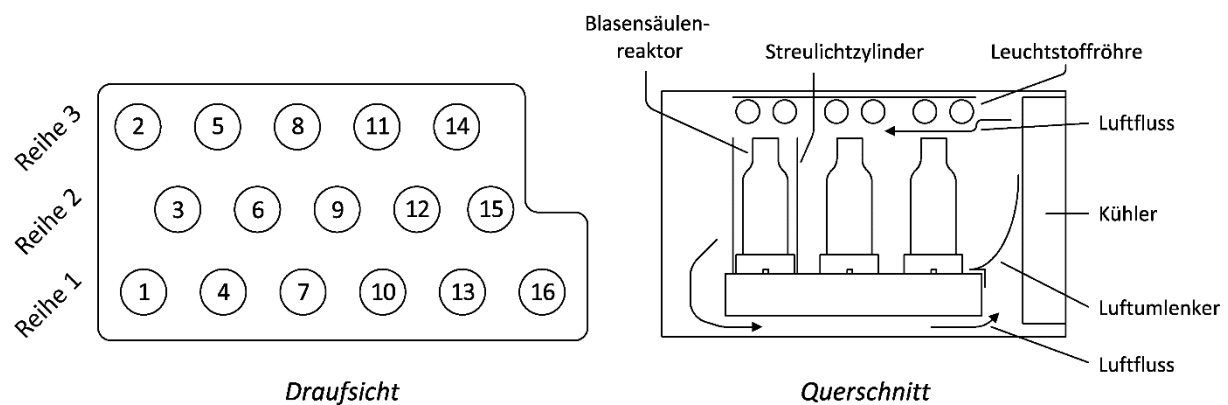
**Tabelle A.1:** Dissoziationskonstanten des Biocarbonat-Puffersystems nach Millero *et al.* (2007) bei 25 °C.

| Salinität, g L <sup>-1</sup> | pK <sub>s1</sub> | pK <sub>s2</sub> |
|------------------------------|------------------|------------------|
| 0                            | 6,20             | 9,95             |
| 60                           | 5,95             | 9,45             |
| 280                          | 6,15             | 9,55             |

### A.2. Geräte

#### A.2.1. Blasensäulenreaktoren

**Abbildung A.1:** Aufbau des modifizierten Profors-Inkubators (Infors HT, Bottmingen, Schweiz) zur Vorkulturerstellung in Blasensäulenreaktoren (Pfaffinger, 2017).



**Tabelle A.2:** Geräte zur Durchführung von Satzprozessen in Blasensäulenreaktoren.

| Gerät                   | Bezeichnung                | Hersteller                      |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Blasensäulenreaktor     | Patent EP0845029 B1        | Altenbach-Rehm & Weuster-Botz   |
| Dreiwegehahn            | Mini-Dreiwegehahn (2-4190) | Neolab, Heidelberg              |
| Durchlaufkühler         | DLK 402 DP                 | Fryka Kältetechnik, Esslingen   |
| Durchlaufkühler         | DLK 60                     | Fryka Kältetechnik, Esslingen   |
| Gasmischstation         | WMR 4000 (Westphal)        | Brooks Instruments, Dresden     |
| Leuchtstoffröhre        | Fluora 77                  | Osram, München                  |
| Leuchtstoffröhre        | SunGlo                     | Hagen, Holm                     |
| Massendurchflussregler  | 585E                       | Brooks Instruments, Dresden     |
| Inkubator (modifiziert) | Profors                    | Infors HAT, Bottmingen, Schweiz |



## A.2.2. Flachplatten-Photobioreaktoren

**Sequenz zur pH-Regelung:**

```
#0,Initial,10 // start of sequence
```

```
Light.sp=0  
Temp.sp=25  
Air_Flow.sp=2.0  
CO2_Flow.sp=0
```

```
if(pH.v<=8.50){CO2_Flow.sp=0;Air_Flow.sp=2.0}  
if(pH.v>=8.51){CO2_Flow.sp=10;Air_Flow.sp=1.990}  
if(pH.v>=8.55){CO2_Flow.sp=15;Air_Flow.sp=1.985}  
if(pH.v>=8.60){CO2_Flow.sp=20;Air_Flow.sp=1.980}  
if(pH.v>=8.65){CO2_Flow.sp=25;Air_Flow.sp=1.975}  
if(pH.v>=8.70){CO2_Flow.sp=30;Air_Flow.sp=1.970}  
if(pH.v>=8.75){CO2_Flow.sp=35;Air_Flow.sp=1.965}  
if(pH.v>=8.80){CO2_Flow.sp=40;Air_Flow.sp=1.960}
```

```
if(seq_time>time(00:01)){seq=1}
```

```
#1, Tag_verzögert, 10 // Sequenz für den Tag
```

```
DEF Set_time = (seq_time/3600)+0  
DEF a = 0.0076  
DEF b = -0.2106  
DEF c = 0.9784  
DEF d = 6.5455
```

```
IF (Set_time <= 14) {Light.sp = a*Set_time^4+b*Set_time^3+c*Set_time^2+d*Set_time} Else {Light.sp  
= 0}
```

```
Temp.sp=0.0082*(Set_time^3)-0.3796*(Set_time^2)+4.3559*Set_time+15.142
```

```
if(pH.v<=8.50){CO2_Flow.sp=0;Air_Flow.sp=2.0}  
if(pH.v>=8.51){CO2_Flow.sp=10;Air_Flow.sp=1.990}  
if(pH.v>=8.55){CO2_Flow.sp=15;Air_Flow.sp=1.985}  
if(pH.v>=8.60){CO2_Flow.sp=20;Air_Flow.sp=1.980}  
if(pH.v>=8.65){CO2_Flow.sp=25;Air_Flow.sp=1.975}  
if(pH.v>=8.70){CO2_Flow.sp=30;Air_Flow.sp=1.970}  
if(pH.v>=8.75){CO2_Flow.sp=35;Air_Flow.sp=1.965}  
if(pH.v>=8.80){CO2_Flow.sp=40;Air_Flow.sp=1.960}
```

```
IF (Set_time > 22) {SEQ = 2}
```

```
#2, Nacht, 10 // Sequenz für die Nacht
```

```
Light.sp = 0  
Temp.sp = 15
```

```
if(pH.v<=8.50){CO2_Flow.sp=0;Air_Flow.sp=2.0}
```

```

if(pH.v>=8.51){CO2_Flow.sp=10;Air_Flow.sp=1.990}
if(pH.v>=8.55){CO2_Flow.sp=15;Air_Flow.sp=1.985}
if(pH.v>=8.60){CO2_Flow.sp=20;Air_Flow.sp=1.980}
if(pH.v>=8.65){CO2_Flow.sp=25;Air_Flow.sp=1.975}
if(pH.v>=8.70){CO2_Flow.sp=30;Air_Flow.sp=1.970}
if(pH.v>=8.75){CO2_Flow.sp=35;Air_Flow.sp=1.965}
if(pH.v>=8.80){CO2_Flow.sp=40;Air_Flow.sp=1.960}

```

```
IF (Seq_time > time(02:00)) {SEQ = 3}
```

#3, Tag, 10 // Sequenz für den Tag ohne Setpoint

```
DEF Set_time2 = seq_time/3600
```

```
DEF a = 0.0076
```

```
DEF b = -0.2106
```

```
DEF c = 0.9784
```

```
DEF d = 6.5455
```

```

if(pH.v<=8.50){CO2_Flow.sp=0;Air_Flow.sp=2.0}
if(pH.v>=8.51){CO2_Flow.sp=10;Air_Flow.sp=1.990}
if(pH.v>=8.55){CO2_Flow.sp=15;Air_Flow.sp=1.985}
if(pH.v>=8.60){CO2_Flow.sp=20;Air_Flow.sp=1.980}
if(pH.v>=8.65){CO2_Flow.sp=25;Air_Flow.sp=1.975}
if(pH.v>=8.70){CO2_Flow.sp=30;Air_Flow.sp=1.970}
if(pH.v>=8.75){CO2_Flow.sp=35;Air_Flow.sp=1.965}
if(pH.v>=8.80){CO2_Flow.sp=40;Air_Flow.sp=1.960}

```

```
IF (Set_time2 <= 14) {Light.sp = a*Set_time2^4+b*Set_time2^3+c*Set_time2^2+d*Set_time2} Else
{Light.sp = 0}
```

```
Temp.sp=0.0082*(Set_time2^3)-0.3796*(Set_time2^2)+4.3559*Set_time2+15.142
```

```
IF (Set_time2 > 22) {SEQ = 2}
```

**Tabelle A.3:** Geräte zur Durchführung von Satzprozessen in Flachplatten-Photobioreaktoren.

| Gerät                        | Bezeichnung               | Hersteller                      |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Flachplatten-Photobioreaktor | Labfors 5 Lux             | Infors HAT, Bottmingen, Schweiz |
| Gelöstsauerstoffsensoren     | VisiFerm DO ECS 120 H0    | Hamilton Germany GmbH, Planegg  |
| pH-Sensoren                  | EasyFerm Plus PHI Arc 120 | Hamilton Germany GmbH, Planegg  |
| Software                     | Iris                      | Infors HAT, Bottmingen, Schweiz |
| Spektrometer                 | Flame-T                   | Ocean Optics Inc., Florida, USA |
| Umlaufkühler LED             | DK2700                    | Wuttke, Schutterwald            |
| Umlaufkühler PBR             | DK1800                    | Wuttke, Schutterwald            |

## A.2.3. Flachgerinnereaktoren

**Tabelle A.4:** Geräte zur Durchführung von Satzprozessen in Flachgerinnereaktoren.

| Gerät   | Bezeichnung                    | Hersteller                            |
|---|--------------------------------|---------------------------------------|
| Aluminiumgestell                              | -                              | Alv́aris, Suhl                        |
| Analog/Digital-Wandler                        | U6                             | Labjack, Lakewood, CO, USA            |
| CO <sub>2</sub> -Massendurchflussregler       | red-y smart                    | Voegtlin, Aesch, Schweiz              |
| CO <sub>2</sub> -Zugabeschlauch               | Solvocarb                      | Linde, Pullach                        |
| Dreiwegehahn                                  | -                              | PVC-Welt, Pegnitz                     |
| Frequenzumrichter                             | Movitrac LTE-B                 | SEW-Eurodrive, Bruchsal               |
| Füllstandssensor                              | LFFS 034                       | Baumer GmbH, Friedberg                |
| Gerinne und Becken (PE-HD)                    | -                              | Rauch oHG, Taufkirchen                |
| Kompaktthermometer                            | TMR31                          | Endress+Hauser, Weil am Rhein         |
| LED-Leuchten                                  | -                              | FutureLED, Berlin                     |
| Magnetkreispumpe                              | BGR 4 RM-PP                    | Sondermann, Köln                      |
| Magnetkreispumpe                              | MKPG3PPE/40-25-055             | Ventaix GmbH, Monschau                |
| Magnetventil                                  | Typ 52                         | Gemü, Ingelfingen                     |
| Verdunstungsausgleich<br>pH-/Temperatursensor | tecLine 201020/51-18-04-18-120 | Jumo, Fulda                           |
| pH-Transmitter                                | ecoTrans pH 03                 | Jumo, Fulda                           |
| Prozessleitsystem                             | Labview 2015                   | National Instruments, Austin, TX, USA |
| Pumpschlauch                                  | Rauspiraflex                   | Liquitec, Rehau                       |
| Schlauchpumpe                                 | Rollit 50                      | Verder GmbH, Wien, Österreich         |
| Volumenstromsensor                            | MIK-5NA65AL343                 | Kobold Messring GmbH, Hofheim         |

## A.2.4. HPLC

**Tabelle A.5:** Geräte zur quantitativen  $\beta$ -Carotin-Bestimmung

| Gerät              | Bezeichnung                                      | Hersteller                        |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| Autosampler        | Ultimate WPS-3000 SplitLoop                      | Thermo Scientific, Waltham, USA   |
| Detektor           | Ultimate DAD-3000                                | Thermo Scientific, Waltham, USA   |
| Pumpe              | Ultimate LPG-3400SD                              | Thermo Scientific, Waltham, USA   |
| Säule              | Develosil 5 $\mu$ m RP-Aqueous C30, 250 x 4,6 mm | Phenomenex, Aschaffenburg         |
| Säulenofen         | Mistral  | Spark Holland, Emmen, Niederlande |
| Software           | Chromeleon 7                                     | Thermo Scientific, Waltham, USA   |
| Vorsäule           | AQ C18 4 x 3,0 mm                                | Phenomenex, Aschaffenburg         |
| Vorsäulenhalterung | SecurityGuard Guard Cartridge Kit KJ0-4282       | Phenomenex, Aschaffenburg         |

## A.3. Allgemeine Geräte

**Tabelle A.6:** Auflistung der allgemeinen Geräte

| Gerät                | Bezeichnung                                       | Hersteller                                |
|----------------------|---|---|
| Analysewaage         | Extend ED124S                                     | Sartorius, Göttingen                      |
| Analysewaage         | MS104S/01   | Mettler-Toledo, Gießen                    |
| Analysewaage         | XA204DR   | Mettler-Toledo, Gießen                    |
| Analysewaage         | Explorer E12145                                   | Ohaus, Parsippany, USA                    |
| Analysewaage         | Explorer E1M312                                   | Ohaus, Parsippany, USA                    |
| Magnetrührplatte     | NeoLab D-6010                                     | NeoLab, Heidelberg                        |
| Mehrfachdispenser    | HandyStep electronic                              | Brand, Wertheim                           |
| Membran-Vakuumpumpe  | Laboport  | KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau       |
| Pipetten             | Transferringpipette S<br>(200 µL, 1000 µL, 10 mL) | Brand, Wertheim                           |
| Plattformwaage       | DE 60K1DL   | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern       |
| Reagenzglasschüttler | Vortex Genie 2                                    | Scientific Industries Inc., New York, USA |
| Refraktometer        | HI 96822  | Hanna Instruments, Woonsocket USA         |
| Schwingmühle         | MM200   | Retsch GmbH, Haan                         |
| Spektralphotometer   | Genesys 10S                                       | Thermo Scientific, Waltham, USA           |
| Spektralphotometer   | Genesys 10UV                                      | Thermo Scientific, Waltham, USA           |
| Spektroradiometer    | Flame-T-VIS-NIR                                   | Ocean Optics, Largo, USA                  |
| Tischzentrifuge      | mySPIN 12   | Thermo Scientific, Waltham, USA           |
| Tischzentrifuge      | Mikro 20  | Hettich, Tuttlingen                       |
| Trockenschrank       | UF450   | Memmert, Schwabach                        |
| Trockenschrank       | UN260   | Memmert, Schwabach                        |
| Verdrängerpipette    | Microman (200 µL, 1000 µL)                        | Gilson, Middleton, USA                    |
| Zentrifuge           | 5810 R  | Eppendorf, Hamburg                        |
| Zentrifuge           | Rotixa 50 RS                                      | Hettich, Tuttlingen                       |
| Zentrifuge           | Rotixa 460R                                       | Hettich, Tuttlingen                       |

## A.4. Chemikalien

**Tabelle A.7:** Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

| Chemikalie                        | Reinheitsgrad                    | Summenformel                      | Hersteller    | Produktnr. |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|------------|
| Acetonitril                       | ~18% Fe                          | $C_6H_8O_7 \cdot nFe \cdot nH_3N$ | Merck         | 103762     |
| Acetonitril                       | ≥99,95%                          | $H_3CCN$                          | VWR           | 83639      |
| Ammoniumeisen(III)-citrat         | ≥99,95%                          | $H_3CCN$                          | J.T. Baker    | 9012       |
| Ammoniumeisen(III)-citrat         | ~18% Fe                          | $C_6H_8O_7 \cdot nFe \cdot nH_3N$ | Roth          | CN77.3     |
| Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat | 81,0 - 83,0%<br>MoO <sub>3</sub> | $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  | Merck         | 101182     |
| Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat | 81,0 - 83,0%<br>MoO <sub>3</sub> | $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  | J.T. Baker    | 0024       |
| Antifoam 204                      | k.A.                             | k.A.                              | Sigma-Aldrich | A6426      |
| Borsäure                          | 99,5 - 100,5%                    | $H_3BO_3$                         | Merck         | 100165     |

| Chemikalie  | Reinheitsgrad          | Summenformel   | Hersteller    | Produktnr.       |
|---|------------------------|--|---------------|------------------|
| Borsäure  | ≥99,8%                 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | Sigma-Aldrich | 31146            |
| Calciumchlorid-Dihydrat                                     | 99,0 - 100,0%          | CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                 | Merck         | 102382           |
| Calciumchlorid-Dihydrat                                     | ≥99,0%                 | CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                 | Roth          | 5239.1           |
| Chloroform  | ≥99,8%                 | CHCl <sub>3</sub>                                      | Honeywell     | 602-006-00       |
| Chloroform  | ≥99,8%                 | CHCl <sub>3</sub>                                      | Labochem      | LC-4919.3        |
| Chloroform  | ≥99,8%                 | CHCl <sub>3</sub>                                      | Roth          | 7331.2           |
| Citronensäure Monohydrat                                    | ≥99,5%                 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>           | Roth          | 3958.2           |
| Cobalt(II)-nitrat-Hexahydrat                                | ≥99%                   | Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O | Merck         | 102536           |
| di-Kaliumhydrogenphosphat                                   | 98,0 - 100,5%          | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                        | AppliChem     | 141512.121<br>0  |
| Ethanol   | ≥99,9%                 | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O                        | Roth          | P076.1           |
| Ethylacetat   | ≥99,5%                 | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>           | Roth          | 6784.4           |
| Ethylacetat   | ≥99,5%                 | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>           | Honeywell     | 607-022-00-<br>5 |
| Ethylendiamin-<br>tetraessigsäure<br>Dinatriumsalz Dihydrat | ≥99,0%                 | Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | Roth          | X986             |
| Ethylendiamin-<br>tetraessigsäure<br>Dinatriumsalz Dihydrat | 99.9%                  | Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | J.T. Baker    | 4040-01          |
| Heptan  | ≥96%                   | C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>                         | Sigma-Aldrich | 592579           |
| Kaliumchlorid   | ≥99,5%                 | KCl  | AppliChem     | A2939            |
| Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat                               | 99,0 - 100,5%          | CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 | Merck         | 102790           |
| Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat                               | 99,0 - 102,0%          | CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                 | Sigma-Aldrich | 31293            |
| Magnesiumsulfat-<br>Heptahydrat                             | ≥48% MgSO <sub>4</sub> | MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | Roth          | 8283.1           |
| Mangansulfat-Monohydrat                                     | 98,0 - 102,0%          | MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                   | Merck         | 105999           |
| Mangansulfat-Monohydrat                                     | ≥99,0%                 | MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                   | Roth          | 4487.1           |
| Natriumcarbonat   | 99.9%                  | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                        | Merck         | 106392           |
| Natriumcarbonat   | ≥99,5%                 | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                        | Roth          | A135.1           |
| Natriumnitrat   | ≥99%                   | NaNO <sub>3</sub>                                      | Roth          | A136.1           |
| Natriumnitrat   | ≥99%                   | NaNO <sub>3</sub>                                      | LaboChem      | LC54691          |
| n-Hexan   | ≥99,9%                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>                         | Roth          | 7339.2           |
| Zinksulfat-Heptahydrat                                      | 99,5 - 103,5%          | ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | Merck         | 108883           |
| Zinksulfat-Heptahydrat                                      | ≥99,5%                 | ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                 | Roth          | K301.1           |